

**In-vitro-Wirksamkeit verschiedener Mundspüllösungen
auf parodontopathogene Mikroorganismen
der Mundhöhle**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Susann Goltz
geboren am 23.06.1978 in Altenburg

Gutachter:

1. PD Dr. S. Eick, Jena
2. Prof. Dr. E. Glockmann, Jena
3. Prof. Dr. H. Jentsch, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.01. 2010

Abkürzungsverzeichnis

A.a./ <i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Aqua dest.	bidestilliertes Wasser
ATCC	American type culture collection
C.a./ <i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CHX	Chlorhexidin
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
F.n./ <i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KBE	Kolonie bildende Einheiten
kDa	Kilo Dalton
<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
MHK	minimale Hemmkonzentration
OMP	Outer membrane proteine
PBS	phosphate buffered saline
P.g./ <i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop
RTX	Repeats in ToXin
<i>S. constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>S. sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>T. forsythia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
TNF	Tumornekrosefaktor

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Klassifikation der Parodontitiden	3
2.2 Pathogenese der Parodontitis	5
2.3 Die Bedeutung parodontopathogener Bakterien für die Auslösung und Manifestation der Parodontitis	6
2.3.1 Porphyromonas gingivalis	7
2.3.2 Aggregatibacter actinomycetemcomitans	8
2.3.3 Fusobacterium nucleatum	10
2.3.4 Streptococcus constellatus/ Streptococcus intermedius	11
2.4 Therapie entzündlicher Parodontalerkrankungen unter Berücksichtigung der adjuvanten Anwendung von oralen Antiseptika, speziell des Chlorhexidins	12
2.4.1 Bedeutung und Wirkungsweise von Chlorhexidin	13
2.4.2 Bedeutung und Wirkungsweise anderer Mundspülpräparate	16
2.5 Resistenzentwicklung bei langfristiger Anwendung von Chlorhexidin	17
3. Zielstellung	19
4. Material und Methoden	20
4.1 Bakterienstämme	20
4.2 Mundspüllösungen	22
4.3 Versuchsreihe I – Wachstumsverhalten nach kurzzeitiger Einwirkung von Mundspüllösungen	23
4.3.1 Versuchsvorbereitungen	23
4.3.2 Einstellen der Bakteriendichte	24
4.3.3 Versuchsablauf	24
4.4 Versuchsreihe II – Untersuchungen zur Resistenzentwicklung nach längerer Einwirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Chlorhexidin, Meridol und Listerine	26
4.4.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	26

4.4.2 Passagieren der Stämme	27
4.4.3 Versuch des Nachweises eines Efflux-Mechanismus mittels Reserpin	28
4.5 Anfertigung von REM-Aufnahmen ausgewählter Stämme	30
5. Ergebnisse	31
5.1 Versuchsreihe I mit kurzzeitiger Einwirkung der Mundspüllösungen	31
5.1.1 Porphyromonas gingivalis	31
5.1.2 Aggregatibacter actinomycetemcomitans	32
5.1.3 Fusobacterium nucleatum	34
5.1.4 Streptococcus constellatus/ Streptococcus intermedius	35
5.1.5 Orale Streptokokken (S. sanguinis, S. oralis, S. salivarius)	36
5.1.6 Enterobakterien (Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae)	37
5.1.7 Candida albicans	38
5.2 Versuchsteil II mit langfristiger Einwirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Mundspüllösungen	39
5.2.1 Chlorhexidin	40
5.2.2 Meridol	41
5.2.3 Listerine	42
5.3 Versuch des Nachweises eines Efflux-Mechanismus	44
5.4 Auswertung der REM-Aufnahmen	45
6. Diskussion	47
6.1 Methodik	47
6.2 Vergleich der antimikrobiellen Aktivität	50
6.3 Temporäre Resistenzentwicklung	53
6.4 Versuch eines Efflux-Nachweises	55
7. Schlussfolgerungen	58
8. Literaturverzeichnis	60
9. Anhang	71
10. Danksagung	87

11. Lebenslauf	88
12. Ehrenwörtliche Erklärung	89

1. Zusammenfassung

Mundspüllösungen werden seit vielen Jahren unterstützend in der Parodontitistherapie angewendet. Hierbei gelten Lösungen mit Chlorhexidindiglukonat aufgrund ihrer hervorragenden antimikrobiellen Eigenschaften als „Goldstandard“. Auf dem Markt werden heute zahlreiche Präparate angeboten, die den Wirkstoff in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten.

Ziel der vorliegenden In-vitro-Studie war es daher, zum einen die antimikrobielle Wirksamkeit von kommerziell erhältlichen Mundspüllösungen und Chlorhexidinzubereitungen nach kurzzeitiger Exposition auf parodontopathogene Mikroorganismen zu bestimmen. Zum anderen sollte untersucht werden, ob eine lang anhaltende Einwirkung der Substanzen eine Resistenzentwicklung der Erreger fördert.

Bei den Testsubstanzen im ersten Teilversuch handelte es sich um vier individuell aus 20%igem Chlorhexidindiglukonat und destilliertem Wasser hergestellte Lösungen in den Konzentrationen 0,06%, 0,12%, 0,2% und 1%, die mit sieben chlorhexidinhaltigen Handelspräparaten in adäquaten Konzentrationen verglichen wurden. Des Weiteren sind die zwei CHX-freien Antiseptika Meridol und Listerine in die Versuchsreihe einbezogen worden. Zu den untersuchten Erregern gehörten Referenzstämme und Patienten-Isolate verschiedener grampositiver und gramnegativer Spezies der Mundhöhle, so auch mehrere Stämme von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis*. Die Mikroorganismen wurden eine Minute mit den Testsubstanzen inkubiert und anschließend ihr Wachstumsverhalten anhand der Zahl Kolonie bildender Einheiten nach 1 h, 6 h und 18 h bestimmt.

Die Ergebnisse unterstreichen die sehr gute, unspezifische antimikrobielle Aktivität des Wirkstoffes Chlorhexidin. Dabei waren die individuell hergestellten Lösungen den meisten Handelspräparaten deutlich überlegen und zeigten eine konzentrationsabhängige Bakterienreduktion bis hin zur vollständigen Elimination. Im Gegensatz dazu war die Effektivität der kommerziellen Chlorhexidinprodukte sehr unterschiedlich. Chlorhexamed-Lösung mit Fluorid (0,06%) und Chlorhexamed-Gel (1%) erzielten fast ebenso gute Ergebnisse wie die Chlorhexidinzubereitungen, während alle anderen Lösungen nur geringe

oder gar keine antibakteriellen Eigenschaften aufwiesen. Die den Handelspräparaten zugesetzten Substanzen, wie Fluoride, Alkohol oder bestimmte Detergenzien, scheinen deren Wirksamkeit positiv oder negativ zu beeinflussen. Diese Studie bestätigt weiterhin die Aussage, dass für die vollständige Elimination der Parodontitisleitkeime *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* höhere Wirkstoffkonzentrationen (mind. 1%) notwendig sind, während für die Abtötung grampositiver, aerober Keime niedrigere Konzentrationen ausreichen.

Bei den beiden chlorhexidinfreien Lösungen konnte Listerine mit seiner sehr guten antiseptischen Wirkung gegenüber Meridol überzeugen. Die Kombination ätherischer Öle und Methylsalicylat erreichte bei allen untersuchten Spezies eine starke Reduktion der Keimzahl, teilweise ließ sich sogar eine komplette Elimination der Bakterien beobachten.

Um die Langzeitwirkung von Mundspüllösungen zu untersuchen wurden im zweiten Teilversuch 50 Passagen der Mikroorganismen auf Agarplatten durchgeführt, welche subinhibitorische Konzentrationen von Chlorhexidin, Meridol und Listerine enthielten. Zu Beginn, nach der Hälfte und am Ende der Passagen wurde jeweils die minimale Hemmkonzentration ermittelt und die Werte miteinander verglichen. Ein Teil der getesteten Keime reagierte dabei unspezifisch mit einer Verringerung der Empfindlichkeit gegenüber eines oder mehrerer Agenzien. Die Erhöhung der MHK-Werte lag zwischen dem Zweifachen und dem Zehnfachen des Ausgangswertes. Da es sich in den meisten Fällen um eine temporäre Erscheinung handelte, lag die Vermutung nahe, dass sich hinter dieser Resistenzentwicklung ein Efflux-Mechanismus verbirgt. Dieser konnte jedoch unter Verwendung des pflanzlichen Alkaloids Reserpin nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen dieser In-vitro-Studie ableiten, dass Chlorhexidin das größte antimikrobielle Potential unter den oralen Antiseptika aufweist. Allerdings sollte darauf geachtet werden, dass für die Wirksamkeit eines Präparates nicht allein der Wirkstoff und seine Konzentration verantwortlich sind, sondern vielmehr die Gesamtformulierung (Galenik) eine entscheidende Rolle spielt. Aufgrund lokaler Nebenwirkungen und der Möglichkeit, bei Langzeitanwendung eine Resistenz bei den Zielorganismen hervorzurufen, sollte die Anwendung auf einen kurzen Zeitraum beschränkt bleiben. Alternativ zu Chlorhexidin erscheint daher die Verwendung von Listerine, auch über einen längeren Zeitraum, zur Reduktion der Keimzahl in der Mundhöhle empfehlenswert.

2. Einleitung

Parodontale Erkrankungen sind zumeist chronische, bakterielle Infektionen mit einer außerordentlich hohen Prävalenz. Circa 80% der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland sind von einer mehr oder minder schweren Form der Parodontitis betroffen.

Im Gegensatz zur Gingivitis ist die Parodontitis mit einer irreversiblen Zerstörung des Zahnhalteapparates verbunden (Horz and Conrads 2007). Verursacht wird die Erkrankung durch eine kleine Gruppe gramnegativer, anaerober bzw. mikroaerophiler Bakterien, wie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythia*, die das subgingivale Areal besiedeln und verschiedene Komponenten der Wirtsabwehr aktivieren (Page and Kornman 1997). Der in Gang gesetzte Entzündungsprozess soll den Wirt schützen, er ist selbst jedoch auch an der Zerstörung des parodontalen Gewebes beteiligt (Jansson 2006). Klinische Zeichen der Erkrankung sind entzündete Zahnfleischtaschen sowie ein fortschreitender Verlust des parodontalen Attachments und des Alveolarknochens (Yamamoto et al. 2007). Ohne entsprechende Behandlung führen Parodontitiden zu Zahnlockerung oder später sogar zum Zahnverlust (Jansson 2006). Es ist außerdem erwiesen, dass orale Infektionen wie die Parodontitis neben diesen lokalen Erscheinungsformen den Krankheitsverlauf einiger Systemerkrankungen, wie z.B. kardio- oder zerebrovaskuläre Krankheiten, periphere Gefäßerkrankungen, Diabetes mellitus und Osteoporose negativ beeinflussen können. Auch über ein gehäuftes Auftreten von Frühgeburten bei Schwangeren mit einer Parodontitis wird berichtet (Cabala et al. 2006). Aus diesen Gründen ist es von außerordentlicher Bedeutung, Entzündungen des Parodonts möglichst frühzeitig zu diagnostizieren. Das Hauptanliegen der sich anschließenden Therapie besteht in der Eliminierung des parodontopathogenen Biofilms, wobei antiseptische Mundspüllösungen eine wertvolle Ergänzung zu mechanischen Maßnahmen darstellen.

2.1 Klassifikation der Parodontitiden

Eine erstmalige spezifische Erwähnung erfuhren parodontale Erkrankungen im Jahre 1723 durch Fauchard, der den Begriff „Skorbut des Zahnfleisches“ einführte (Gold 1985). Seitdem wurden diese Krankheiten immer wieder neu benannt, wobei die Einteilungen auf dem

jeweiligen Wissensstand über ätiologische Faktoren, pathologische Veränderungen und klinische Manifestationen basierten (van der Velden 2005). 1989 einigten sich Wissenschaftler und Kliniker des Fachgebietes Parodontologie erstmals auf eine international einheitliche Klassifikation. Aufgrund von Unzulänglichkeiten in der Terminologie, wie Überschneidungen in den Kategorien, uneindeutige Zuordnungskriterien und der fehlenden Berücksichtigung gingivaler Krankheitsprozesse kam es in den folgenden Jahren immer wieder zu Modifizierungen in der Nomenklatur. Die aktuelle Klassifikation wurde 1999 auf dem „International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions“ in Oakbrook (Illinois, USA) beschlossen. Danach werden parodontale Erkrankungen wie folgt eingeteilt:

1. Gingivale Erkrankungen

- a) plaque-induziert
- b) nicht plaque-induziert

2. Chronische Parodontitis

- a) lokalisiert
- b) generalisiert

3. Aggressive Parodontitis

- a) lokalisiert
- b) generalisiert

4. Parodontitis als Manifestation einer Systemerkrankung

5. Nekrotisierende Parodontalerkrankungen

6. Abszesse des Parodonts

7. Parodontitis im Zusammenhang mit endodontischen Läsionen

8. Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände

(Armitage 1999)

Neu in dieser Klassifikation ist die Auflistung gingivaler Erkrankungen, die in früheren Einteilungen nicht berücksichtigt wurden. Als weitere wesentliche Änderung erfolgte die Umbenennung der Erwachsenenparodontitis in chronische Parodontitis, da diese in der Regel langsam fortschreitende Erkrankung sowohl bei Erwachsenen als auch bereits bei Jugendlichen beobachtet werden kann.

Die Form der Parodontitis, die mit starker und oftmals rascher Destruktion des bindegewebigen Attachments und Alveolarknochens einhergeht, wird heute als aggressive Parodontitis bezeichnet und ersetzt den früher verwendeten Begriff der Early Onset Periodontitis. Bei der aggressiven Parodontitis kann ebenso wie auch bei der chronischen Erkrankung je nach Anzahl der betroffenen Zähne eine lokalisierte von einer generalisierten Form unterschieden werden (Armitage 1999).

2.2 Pathogenese der Parodontitis

Die Ätiologie der Parodontitis ist multifaktoriell, als Hauptursache gelten jedoch bestimmte, überwiegend gramnegative, anaerobe bzw. mikroaerophile Bakterienspezies, welche die subgingivale Plaque besiedeln (Page and Kornman 1997) und die mit der Wirtsabwehr in Wechselwirkung treten (Gemmell et al. 1997).

Die dentale Plaque stellt einen Biofilm dar, in dem die Mikroorganismen organisiert sind und dessen Stoffwechselleistungen, wie auch die Expression von Virulenzfaktoren, gegenüber der Einzelkultur um ein Vielfaches gesteigert sind. Somit ist auch dessen Pathogenität deutlich erhöht (Page et al. 1997). Die Bakterien und ihre Stoffwechselprodukte reagieren mit der marginalen Gingiva und penetrieren auch in das darunter gelegene Bindegewebe. Aus dem entzündeten feinen Blutgefäßplexus kommt es zunächst zu einer enormen Migration von neutrophilen Granulozyten. Kollagen und andere extrazelluläre Matrixbestandteile werden in der Folge zerstört. Die Ausdehnung der supragingivalen Plaque in die Tiefe führt schließlich zur Proliferation des koronalen und später auch apikalen Sulkusepithels und somit zur Ausbildung einer parodontalen Tasche. In der Sulkusflüssigkeit sind neben den Leukozyten dann auch zunehmend T- und B-Lymphozyten zu finden, wobei sich die B-Zellen später zu Antikörper-bildenden Plasmazellen differenzieren (Kornman et al 1997). Durch die ausgelöste Immunreaktion des Wirtes werden Entzündungsmediatoren, wie Zytokine, Prostaglandine und Matrixmetalloproteinasen produziert. Diese verursachen durch ihre Wirkungsweise eine fortschreitende Destruktion des parodontalen Stützgewebes. Da somit die Abwehrreaktion des Wirtes, die eigentlich dazu dienen soll, die betroffenen Strukturen zu schützen, einen großen Anteil zu deren Zerstörung beiträgt, können die verursachenden Bakterien nur indirekt für den Verlauf und das Resultat der Erkrankung verantwortlich gemacht werden (Page and Kornman 1997).

Obwohl das Vorhandensein bestimmter Bakterien, wie *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* für die Ätiologie essentiell ist, sind für den Schweregrad und die Progression der Parodontitis weitere Faktoren von Bedeutung. Dabei spielen genetisch bedingte und Umweltfaktoren gleichermaßen eine wichtige Rolle, da beide wesentlich in die Immunantwort eingreifen können (Page and Kornman 1997). Vor allem das Rauchen stellt einen entscheidenden Risikofaktor für den Verlauf parodontaler Erkrankungen dar (Salvi et al. 2005). Als genetische Einflussfaktoren sind Polymorphismen in den Genen IL-1 und TNF- α (Nunn 2003) sowie Störungen in der Phagozytosefunktion neutrophiler Granulozyten (Sigusch 1998) beschrieben worden. Auch systemische Erkrankungen, vor allem Diabetes mellitus und HIV, können den Verlauf parodontaler Erkrankungen negativ beeinflussen. Als weitere Risikofaktoren gelten höheres Lebensalter, mangelnde Mundhygiene und Stress (Nunn 2003).

2.3 Die Bedeutung parodontopathogener Bakterien für die Auslösung und Manifestation der Parodontitis

Die Mundhöhle wird von einer Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt, wobei bisher ca. 500 verschiedene Spezies entdeckt worden sind (Feng and Weinberg 2006). Zu dieser Flora gehören neben aeroben und fakultativ bzw. obligat anaeroben Bakterien auch Viren, Pilze und teilweise sogar Protozoen (Schuster 1999). Während die meisten dieser Arten harmlos sind und sich mit dem Wirt in einem ökologischen Gleichgewicht befinden, spielen einige wenige Bakterienspezies bei der Ätiologie und Pathogenese von Parodontalerkrankungen eine wichtige Rolle. Von besonderer Bedeutung sind *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *Treponema denticola*, die Socransky et al. 1998 in ihrer Clusteranalyse der subgingivalen Plaque dem roten Komplex zuordneten. Dazu gehören weiterhin die Spezies *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* und *Parvimonas micros*, welche als oranger Komplex bezeichnet werden und eng mit dem Vorhandensein von Bakterien aus erstgenannter Gruppe assoziiert sind.

A. actinomycetemcomitans steht in keiner erkennbaren Beziehung zu einem der fünf von Socransky et al. (1998) definierten Komplexe, sein Auftreten ist jedoch bei einem Teil der Parodontalerkrankungen, insbesondere der aggressiven Parodontitis, essentiell.

Die beiden Parodontitisleitkeime *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* sowie die Bedeutung von *F. nucleatum* und *S. constellatus/ S. intermedius* sollen im Folgenden näher erläutert werden.

2.3.1 Porphyromonas gingivalis

P. gingivalis ist ein gramnegatives, obligat anaerobes Stäbchenbakterium, von dem bisher zahlreiche Genotypen mit unterschiedlicher Virulenz isoliert werden konnten (Page 1995). Es ist ein typischer Markerkeim einer fortgeschrittenen Parodontitis und lässt sich beim Gesunden nur in Ausnahmefällen nachweisen (van Winkelhoff et al. 2002), wobei es sich dann wahrscheinlich um avirulente Klone oder solche mit nur geringem pathogenen Potential handelt. Dieser typische Spätbesiedler parodontaler Taschen besitzt zahlreiche Virulenzfaktoren, die für die Progression der Erkrankung verantwortlich sind.

Fimbrien ermöglichen dem Bakterium, in Interaktion mit anderen Bakterienzellen und Speichelkomponenten zu treten; sie dienen in erster Linie jedoch der Adhärenz an Zellen des Parodontalgewebes, wie Epithel und Fibroblasten (Amano 2003). Aufgrund von Wechselwirkungen der Fimbrien mit Oberflächenproteinen der Gingivaepithelzellen wird auf diese Weise auch die Invasion in die Wirtszelle vorbereitet. So können innerhalb kurzer Zeit zahlreiche Bakterien in die Gewebszellen penetrieren und dort auch persistieren (Yilmaz et al. 2003).

Neben einer Kapsel, die dem Bakterium antiphagozytäre Eigenschaften verleiht, besitzt *P. gingivalis* die Fähigkeit, Abwehrzellen des Wirtes zu inaktivieren und die Immunantwort zu stimulieren (Andrian et al. 2006). *P. gingivalis* induziert u.a. durch das in seiner Membran befindliche Lipopolysaccharid, welches ein Endotoxin darstellt, die überschießende Produktion von Zytokinen, wie z.B. IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α in Makrophagen und anderen Zellen (Andrian et al. 2006, Shapira et al. 1998). Diese Zellregulatorproteine, die für zahlreiche physiologische Vorgänge im Organismus essentiell sind, spielen vor allem bei Entzündungsreaktionen und der Immunmodulation eine wesentliche Rolle (Gemmell et al. 1997). Abnorm hohe Konzentrationen bestimmter Zytokine (vorrangig IL-1 und TNF- α) führen infolge ihrer Stoffwechselleistungen jedoch zu Gewebedestruktion und Knochenverlust (Birkedal-Hansen 1993).

Des Weiteren produziert *P. gingivalis* zahlreiche Enzyme, u.a. Kollagenasen, Phospholipase A, Fibrinolysin und Proteasen, welche ebenso wie die freigesetzten toxischen Stoffwechselendprodukte Propionat, Butyrat und Ammoniak maßgeblich zur Zerstörung des Parodontiums beitragen (Takahashi et al. 2000, Gusman et al. 2001).

Potempa et al. (1997) erkannten dabei die Schlüsselfunktion spezifischer Cysteinproteinasen, der so genannten Gingipaine, welche für 85% der proteolytischen Aktivität des Bakteriums verantwortlich gemacht werden. Diese arginin- und lysinspezifischen Proteasen werden durch drei Gene codiert, wobei für die Synthese der argininspezifischen Enzyme zwei verschiedene Gene (*rgpA* und *rgpB*) verantwortlich sind, während nur ein einzelnes Gen (*kgp*) die lysinspezifischen Proteasen verschlüsselt (Mikolajczyk-Pawlinska et al. 1998). Diese Gingipaine sind in der Lage, sowohl sekretorisches als auch Serum-IgA und IgG zu spalten und die Funktion polymorphkerniger Leukozyten, die eine entscheidende Rolle bei der Abwehrreaktion parodontopathogener Bakterien einnehmen, zu stören (Abe et al. 1998). Weiterhin bauen sie Zytokine, die Komplementfaktoren C3 und C5 sowie einen Teil von Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen (CD14) und T-Zellen (CD4, CD8) ab (Imamura et al. 2003, Sundqvist et al. 1985). Bekannt ist außerdem, dass sie die Bildung von Matrixmetalloproteinasen in Fibroblasten stimulieren (Imamura et al. 2003), bei der Ausbildung der Bakterienfimbrien mitwirken und die Fähigkeit besitzen, Kollagen vom Typ I und Typ IV abzubauen (Kadowaki et al. 1994 und 1998).

Sowohl die direkte destruktive Wirkung auf die Gewebe des Parodonts als auch die zahlreichen Möglichkeiten, sich der Wirtsabwehr zu entziehen, unterstreichen den entscheidenden Einfluss von *P. gingivalis* bei der Manifestation und Progression der Parodontitis.

2.3.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Dieses bis 2006 als *Actinobacillus actinomycetemcomitans* bezeichnete Bakterium wurde erstmals im Jahre 1912 von Klinger im Zusammenhang mit einer Aktinomykose beschrieben (Klinger 1912). Bei *A. actinomycetemcomitans* handelt es sich um ein gramnegatives, mikroaerophiles und fakultativ anaerobes Bakterium, von dem heute die fünf Serotypen a, b, c, d und e bekannt sind. Jeder Wirt beherbergt jeweils nur einen der Serotypen, wobei bei den

klinischen Isolat von Parodontitispatienten der Typ b dominiert (Zambon et al. 1983). Elektronenmikroskopisch lassen sich glatte, transparente Kolonien von solchen mit rauer, opaker Oberfläche unterscheiden, was auf die Anzahl der vorhandenen Fimbrien zurückzuführen ist. Die glatten Formen haben davon nur wenige oder gar keine, der Besitz von so genannten Membranvesikeln verleiht ihnen jedoch ein ebenso gutes Adhärenzvermögen wie den Stämmen mit Fimbrien (Inouye et al. 1990).

A. actinomycetemcomitans verfügt über eine breite Palette von Virulenzfaktoren, von denen bisher aber nur ein kleiner Teil erforscht werden konnte. Fest steht jedoch, dass diesem Stäbchenbakterium zahlreiche Mechanismen zu Eigen sind, die die Besiedlung und Persistenz in der Mundhöhle ermöglichen (Five-Taylor et al. 1999).

Die Bakterien können sich an sämtliche Oberflächen in der Mundhöhle anheften. Dazu gehören neben Zahnoberflächen, anderen Bakterien und Epithelzellen auch extrazelluläre Matrixbestandteile. Diese Adhärenz wird durch bestimmte Elemente der Bakterienmembran, die so genannten Adhäsine, zu denen Fimbrien, Vesikel und andere Membranproteine gehören, gewährleistet (Five-Taylor et al. 1999).

Die Fähigkeit zur Invasion von Gingivazellen erlaubt es *A. actinomycetemcomitans*, sich im parodontalen Gewebe auszubreiten und sichert langfristig sein Überleben in der Mundhöhle. In mehreren Studien zur Erforschung der Invasionswege von *A. actinomycetemcomitans* wurde eine rezeptorvermittelte, mikrofilamentabhängige Endozytose als Eintrittsmechanismus in die Wirtszellen beschrieben. Voraussetzung ist dabei, dass sowohl das Bakterium als auch die Zielzelle metabolisch aktiv sind (Meyer et al. 1991). Eingeschlossen in Vakuolen ist das Bakterium dann in der Lage, die Funktion und Signaltransduktionswege der befallenen Zelle für seine eignen Zwecke auszunutzen und kann sich darüber hinaus auf diese Weise den Abwehrmechanismen des Wirtes entziehen (Fives-Taylor et al. 1995).

Ein weiterer wesentlicher Virulenzfaktor von *A. actinomycetemcomitans* ist das Leukotoxin. Bei diesem 116 kDa schweren Protein handelt es sich um ein zytotoxisches Exoprotein aus der RTX-Familie, welches die Fähigkeit besitzt, Poren zu bilden (Guthmiller et al. 2001). Zielzellen des Leukotoxins sind polymorphkernige neutrophile Leukozyten und Monozyten des Wirtes, die durch Änderung der Membranpermeabilität und damit einhergehende veränderte osmotische Verhältnisse zerstört werden (Iwase et al. 1992).

A. actinomycetemcomitans verfügt weiterhin über zahlreiche Komponenten auf der Membranoberfläche, die einerseits selbst als potentielle Stimulatoren der Knochenresorption wirken und andererseits durch die Induktion der verstärkten Zytokinfreisetzung die Gewebedestruktion vorantreiben. Einige dieser Faktoren sind außerdem in der Lage, die Proliferation von Fibroblasten und deren Produktion von extrazellulären Matrixbestandteilen zu hemmen (Wilson and Henderson 1995).

Auch Lipopolysaccharide, Kollagenasen (Fives-Taylor et al. 1999) und das cytholethal distending toxin (CDT), welches mit Ausnahme der Fibroblasten des Parodontalligaments das Wachstum zahlreicher eukaryotischer Zellarten hemmt (Kanno et al. 2005), sind als Virulenzfaktoren von *A. actinomycetemcomitans* bekannt.

2.3.3 *Fusobacterium nucleatum*

Bei *F. nucleatum* handelt es sich um ein saccharolytisches, spindelförmiges, gramnegatives, anaerobes Bakterium, welches von Socransky et al. (1998) dem orangen Komplex zugeordnet wurde. Zu dieser Gruppe gehören neben der Gattung *Fusobacterium* auch die Spezies *Prevotella* und *Parvimonas*, die zum einen bei zahlreichen Allgemeininfektionen und zum anderen auch bei der Entstehung parodontaler Erkrankungen mitwirken.

Als Frühbesiedler parodontaler Taschen besitzt *F. nucleatum* die Fähigkeit, an Epithelzellen zu binden und ist in der Lage, sich den wechselnden pH-Bedingungen im gingivalen Sulkus anzupassen. Das saure Milieu, welches in den frühen Phasen der Parodontitis im Sulkus vorherrscht, kann von *F. nucleatum* mit Hilfe seiner Stoffwechselleistungen neutralisiert werden, sodass das Bakterium auch als Wegbereiter für säureempfindlichere Spezies, wie *P. gingivalis*, gilt (Zilm et al. 2007). Darüber hinaus spielt *F. nucleatum* eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung mikrobieller Gemeinschaften, indem es als Brückenbildner zwischen Früh- und Spätbesiedlern der Zahnfleischtasche fungiert (Kolenbrander et al. 1995). Koaggregationen mit *Treponema denticola*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* und anderen Spezies der Mundhöhle, die selbst keine direkte Adhärenz zur Zahnoberfläche besitzen, sind ebenfalls beschrieben worden (Bolstad et al. 1996).

Als Virulenzfaktoren besitzt *F. nucleatum* Lipopolysaccharide und so genannte OMPs, die als Proteine der äußeren Membran unter anderem an der Ausbildung der bakteriellen Koaggregationen beteiligt sind. Weiterhin produziert das Bakterium toxische Metabolite, wie Butyrat, Propionat und Ammoniak, die die Proliferation von Gingivafibroblasten hemmen (Bolstad et al. 1996). Auch eine 65 kDa Serin-Protease, die sowohl die extrazellulären Matrixproteine Fibrinogen und Fibronectin als auch Kollagen vom Typ I und IV abbauen kann und darüber hinaus in der Lage ist, die α -Kette von IgA zu spalten, spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung des parodontalen Attachmentverlustes (Bachrach et al. 2004).

F. nucleatum allein besitzt zwar eine geringere Pathogenität als beispielsweise *A. actinomycetemcomitans* oder *P. gingivalis*, die Bedeutung der Spezies für das Auftreten parodontaler Läsionen ist jedoch erheblich. Das Bakterium spielt eine Schlüsselrolle bei der Plaqueformation, schafft als Frühbesiedler parodontaler Taschen die entsprechenden Voraussetzungen für nachfolgende Spezies und wirkt durch Ausbildung von Koaggregationen synergistisch mit anderen Bakterien auf die Gewebedestruktion ein (Kolenbrander et al. 1995, Bolstad et al. 1996).

2.3.4 Streptococcus constellatus/ Streptococcus intermedius

Diese beiden Spezies gehören zu den oralen Streptokokken und bilden gemeinsam mit *Streptococcus anginosus* die „Milleri-Gruppe“. Diese Untergruppe von kugelförmigen, grampositiven und unbeweglichen Kokken gehört zur Standortflora des Rachenraums sowie des Intestinal- und Genitaltraktes und spielt hauptsächlich bei pyogenen Infektionen in diesen Abschnitten eine wichtige Rolle (Gossling 1988).

Die „Milleri-Gruppe“ wird hinsichtlich ihrer Parodontopathogenität ebenfalls dem „orangenen Komplex“ zugeordnet. *S. constellatus* und *S. intermedius* werden vor allem im Zusammenhang mit refraktären Parodontitisfällen immer wieder erwähnt und hier regelmäßig aus den persistierenden Zahnfleischtaschen isoliert (Colombo et al. 1998, Magnusson and Walker 1996).

Als Virulenzfaktoren werden in der Literatur neben Proteasen (Homer et al. 1990), Glycosidasen (Beighton and Whiley 1990) und Hyaluronidasen (Homer et al. 1993) auch

albuminbindende und immunsuppressive Proteine (Willcox et al. 1993, Lima et al. 1992) erwähnt. Die genauen pathogenen Mechanismen der beiden Spezies sind derzeit allerdings noch nicht aufgeklärt (Nagamune et al. 2000).

2.4 Therapie entzündlicher Parodontalerkrankungen unter Berücksichtigung der adjuvanten Anwendung von oralen Antiseptika, speziell des Chlorhexidins

Bei der Therapie entzündlicher Parodontopathien werden eine vollständige Gesundung des Gewebes sowie eine Wiederherstellung der anatomischen und physiologischen Verhältnisse angestrebt. Von einem Behandlungserfolg kann ausgegangen werden, wenn die Zeichen der Entzündung, wie Sondierungsbluten und die Taschenaktivität, nicht mehr nachweisbar sind. Die Eradikation der verursachenden Keime ist für den Erfolg der Therapiemaßnahmen dabei von entscheidender Bedeutung. Auch ein klinischer Attachmentgewinn bzw. die Verhinderung eines weiteren Attachmentverlustes, die Elimination oder Reduktion der Sondierungstiefe und eine Stabilisierung gelockerter Zähne stellen einzelne Behandlungsziele dar. Als langfristiges Ziel gilt es, den erreichten, gesunden Zustand der parodontalen Gewebe dauerhaft zu erhalten (Hellwig et al. 2003).

Unerlässlich für den Behandlungserfolg ist die aktive Mitarbeit des Patienten, wobei die Optimierung der Mundhygiene und die Motivation zu einer gesunden Lebensweise Voraussetzung für alle nachfolgenden Therapieschritte sind. Die Plaquekontrolle sollte in erster Linie mit mechanischen Mitteln erfolgen, sie kann jedoch vor allem bei Patienten mit eingeschränkten manuellen Fähigkeiten durch die Anwendung antimikrobieller Mundspüllösungen, wie zum Beispiel Chlorhexidin oder Listerine, sinnvoll unterstützt werden (Barnett 2003).

Grundsätzlich kann zwischen konservativen, chirurgischen und adjuvanten, chemotherapeutischen Therapieverfahren unterschieden werden, die sowohl einzeln als auch in Kombination anwendbar sind.

Als Standard haben sich heute konservative, nicht-chirurgische Verfahren durchgesetzt. Sigusch et al. empfehlen ein so genanntes Zwei-Schritt-Konzept. Im ersten Schritt, der sich

über 4-5 Sitzungen erstreckt, erfolgt die Entfernung aller supra- und subgingivalen Beläge, während im zweiten Schritt das Root-planing mit gleichzeitiger geschlossener Kürettage in einer Sitzung durchgeführt wird. Simultan kann für eine Woche ein Antibiotikum systemisch verabreicht werden (Sigusch et al. 2000, 2001).

Die chirurgische Therapie ist in der Regel besonders schweren Parodontitiserkrankungen vorbehalten oder solchen Fällen, in denen eine vorausgegangene konservative Behandlung nicht zum gewünschten Behandlungsziel geführt hat (Ziada et al. 2007).

Der Einsatz von Antibiotika im Rahmen der Therapie parodontaler Erkrankungen wird schon seit vielen Jahren praktiziert. Vor allem Metronidazol, Doxycyclin und Clindamycin zeigen eine gute Wirksamkeit gegenüber parodontopathogenen Bakterien (Gordon and Walker 1993). Erfolg versprechend sind neueren Studien zufolge auch die Fluorchinolone, wie das Moxifloxacin (Dalhoff and Schmitz 2003, Eick et al. 2004). Antibiotika sollten jedoch stets nur in Kombination mit mechanischen Behandlungsmethoden verwendet werden, da sie allein nicht in der Lage sind, die Infektion vollständig zu beseitigen (Eick und Pfister 2004). Außerdem sollte sich der Einsatz aufgrund der Gefahr einer Resistenzentwicklung der entsprechenden Keime auf besonders schwierige Erkrankungsfälle beschränken (Gordon and Walker 1993).

Eine weitere Gruppe oraler Antiseptika ist kommerziell erhältlich und somit einem größeren Patientenstamm frei zugänglich. In zahlreichen Studien ist die antibakterielle, entzündungshemmende Wirkung von chemischen Verbindungen in Form von Mundspüllösungen oder Gelen nachgewiesen worden. Gute plaquehemmende Ergebnisse können demnach sowohl mit Triclosan (Bhargava and Leonard 1996) als auch mit Listerine und Meridol erzielt werden. Hinsichtlich seines antimikrobiellen Potentials sowie seiner Antiplaque- und Antigingivitis-Effekte ist das Chlorhexidin jedoch allen anderen Verbindungen deutlich überlegen (Brex et al. 1990).

2.4.1 Bedeutung und Wirkungsweise von Chlorhexidin

Obwohl der Wirkstoff Chlorhexidin bereits 1954 von Davies et al. erstmals beschrieben wurde, ist seine Bedeutung für die Zahnmedizin erst durch klinische Studien von Loe und

Schiött (1970), die den plaquehemmenden Effekt des Chlorhexidins nachwiesen, bekannt geworden. Das kationische Bis-biguanid gilt heute als „Goldstandard“ in der oralen antiseptischen Therapie und wird meist als Chlorhexidin-Diglukonat-Salz in Lösungen (0,06-0,2%) und Gelen (max. 1%) angewendet.

Chlorhexidin zeichnet sich durch seine unspezifische antimikrobielle Wirksamkeit, seine Plaquehemmung und die hohe Substantivität in der Mundhöhle aus. Es wirkt bakteriostatisch und bakterizid gegen grampositive Bakterien, in höheren Konzentrationen (ab 0,2%) auch bakterizid gegen gramnegative Spezies (Hellwig et al. 2003). Auch Pilze wie *Candida albicans* (Tobgi et al. 1987) und ein Teil der Viren (Park and Park 1989, Bernstein et al. 1990) gehören zum Wirkspektrum. Durch seine chemische Struktur ist Chlorhexidin in der Lage, sich an die Oberflächen der oralen Hart- und Weichgewebe zu binden und steht so als Reservoir für einen „slow release“ bis zu zwölf Stunden zur Verfügung (Mandel 1994, Schiott 1973).

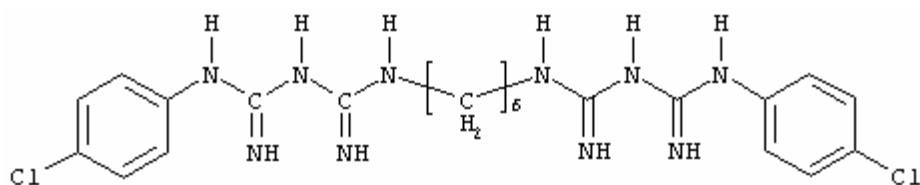


Abb. 1: Strukturformel von Chlorhexidin

Auf Grund des kationischen Charakters seiner funktionellen Gruppen kommt es zu einer elektrostatischen Anziehung des Chlorhexidins an die negativ geladenen Oberflächen von Zähnen, Gingiva, Mukosa sowie Plaque. Durch diese hohe Affinität zu Anionen ist das Biguanid zudem in der Lage, Bindungsstellen oraler Mikroorganismen auf der Zahnoberfläche zu blockieren, wodurch sein Antiplaque-Effekt begründet wird. Des Weiteren schädigt Chlorhexidin Bakterienzellen, indem es die Permeabilitätsfunktion der Zellwand zerstört und so durch Verschiebung des osmotischen Gleichgewichtes zur Präzipitation des Zytoplasmas führt. Eine Beeinflussung des bakteriellen Glukosestoffwechsels in Folge Hemmung membrangebundener ATPasen durch Chlorhexidin ist in der Literatur ebenfalls beschrieben worden (Hellwig et al. 2003).

Anwendung findet Chlorhexidin in der Zahnmedizin vor allem als Mittel zur chemischen Plaquekontrolle und spielt als solches für die Karies- und die Parodontitisprävention eine gleichermaßen wichtige Rolle. Weiterhin dient es vor chirurgischen Eingriffen als orales

Antiseptikum sowie als Wurzelkanalspülung in der endodontischen Therapie (Ferraz et al. 2007). Aber auch für die Behandlung parodontaler Erkrankungen ist der Wirkstoff Chlorhexidin von entscheidender Bedeutung und bis heute in seiner Wirksamkeit durch kein anderes antibakterielles Agens ersetzbar. Zumeist in Form von Mundspüllösungen wird es sowohl in der Vorbehandlungsphase als auch postoperativ im Recall zur Infektionsminimierung bzw. -prophylaxe eingesetzt. Faveri et al. (2006) konnten in ihrer Studie nachweisen, dass die adjuvante Anwendung von Chlorhexidin zu Scaling und Rootplaning deutlich bessere Ergebnisse erzielte als mechanische Maßnahmen allein. Darüber hinaus wird das Biguanid auch intraoperativ als lokale Taschenspülung oder in Form des sogenannten PerioChip, der als resorbierbares CHX-Reservoir in die parodontale Tasche eingebracht wird, erfolgreich angewendet (Killooy 1999).

Obwohl Chlorhexidin heute als therapeutischer Standard unter den oralen Antiseptika gilt, gibt es unter den kommerziell erhältlichen Produkten, die mit dem Wirkstoff werben, dennoch (zum Teil erhebliche) Unterschiede in deren Effektivität. Dabei spielt vor allem die Zusammensetzung des Agens eine wichtige Rolle, da sowohl das Vorhandensein als auch das Fehlen bestimmter Zusatzstoffe wesentlich die Verfügbarkeit des Chlorhexidins beeinflusst (Mendieta et al. 1994). So kann zum Beispiel das anionische Tensid Natriumlaurylsulfat, das als Detergens bei einem Großteil der auf dem Markt befindlichen Zahnpasten verwendet wird, das Biguanid neutralisieren und so seine Wirkung aufheben. Aus diesem Grund wird heute zwischen dem täglichen Zähneputzen und dem Spülen mit einer Chlorhexidinlösung ein Zeitintervall von mindestens einer halben Stunde empfohlen (Kolahi and Soolari 2006). Aber auch Fluoride oder Alkohol als Zusatz können die Eigenschaften von Chlorhexidin beeinträchtigen bzw. steigern (Herrera et al. 2003), sodass für die Effektivität eines Präparates immer seine Gesamtformulierung (Galenik) entscheidend ist.

Bei längerfristiger Anwendung von Chlorhexidin können lokale Nebenwirkungen beobachtet werden. Dabei handelt es sich in erster Linie um bräunliche Verfärbungen von Zähnen und Füllungen, die als ästhetisch störend empfunden werden. Aber auch über Irritationen der Schleimhaut, Discolorationen der Zunge und Beeinträchtigung der Geschmacksempfindung wird immer wieder berichtet (Floetra et al. 1971).

Obwohl in einigen In-vitro-Studien auch auf die zytotoxischen Eigenschaften des Chlorhexidins gegenüber verschiedener humaner Zelllinien hingewiesen wird (Giannelli et al. 2008, Pucher and Daniel 1992), konnten diese in vivo bisher nicht belegt werden.

Systemische Nebenwirkungen sind aufgrund der minimalen gastrointestinalen Absorption des Chlorhexidins nicht zu erwarten (Ibáñez and Casamada 2005).

2.4.2 Bedeutung und Wirkungsweise anderer Mundspülpräparate

Alternativ zu Chlorhexidin wird in der Zahnheilkunde häufig das kommerziell erhältliche Produkt Meridol angewendet. Die Kombination von Aminfluorid und Zinnfluorid stellt den Hauptbestandteil dieser Lösung dar und ist für seine antimikrobielle Wirkung verantwortlich. Obwohl in mehreren Studien über eine deutliche Plaquereduktion durch Meridol berichtet wird (Auschill et al. 2005, Brex et al. 1992), reicht seine Effektivität gegenüber parodontopathogenen Bakterien ebenso wie seine Antigingivitis-Wirkung nicht an die des Chlorhexidins heran (Brex et al. 1993). Da allerdings lokale Nebenwirkungen deutlich seltener auftreten, ist Meridol durchaus auch für eine dauerhafte Ergänzung zur mechanischen Mundhygiene geeignet (Zimmermann et al. 1993). Um die Wirkung der Fluoride mit der des Chlorhexidins zu vereinen, sind neuerdings auch Meridol-Produkte auf dem Markt, die einen Zusatz von max. 0,2% CHX enthalten.

Ein weiteres bekanntes Präparat, das als Mundspülung verwendet wird, ist Listerine. Die Wirkstoffe sind hier ätherische Öle, wie Thymol, Menthol und Eucalyptol ergänzt durch entzündungshemmendes Methylsalicylat. Diese natürlichen Substanzen sind in der Lage, in den Biofilm einzudringen und die Bakterien schnell und wirkungsvoll zu eliminieren. Hinsichtlich seiner antibakteriellen Wirksamkeit ist Listerine mit Meridol vergleichbar, wobei einige Studien eine höhere Effektivität bei der Plaquehemmung ermittelten (Riep et al. 1999, Pan et al. 1999), andere dagegen eine geringere Wirkung gegenüber Meridol angaben (Brex et al. 1992).

Neben Listerine und Meridol gibt es noch andere Substanzen, die eine mehr oder weniger starke antimikrobielle Wirksamkeit aufweisen. So ist z.B. die Anwendung des lipidlöslichen antibakteriellen Agens Triclosan in zahlreichen Zahnpasten und Spüllösungen weit verbreitet

(Saxton 1989). Die Effektivität der Triclosan-Produkte liegt jedoch ebenfalls deutlich unter der des Chlorhexidins (Renton-Harper et al. 1996, Jenkins et al. 1994). Auch das alkoholische Sanguinaria oder die quarternäre Ammoniumverbindung CPC konnten als orale Antiseptika nicht überzeugen (Kurbad et al. 1990, Altenhofen et al. 1989, Moran et al. 2000).

2.5 Resistenzentwicklung bei langfristiger Anwendung von Chlorhexidin

Antibiotika wurden in den 40er Jahren erstmals synthetisch hergestellt und finden seitdem in der Medizin Anwendung bei der Therapie mikrobiell verursachter Krankheiten. Doch obwohl mit dieser Gruppe von Chemotherapeutika heute zahlreiche Infektionskrankheiten sehr erfolgreich behandelt werden können, sollte deren Einsatz dennoch moderat und nur nach exakter Diagnose erfolgen (Glick 2005). Der exzessive und oftmals unsachgemäße Gebrauch von Antibiotika führte im Laufe der Jahre zur Adaptation zahlreicher Bakterienstämme. Diese entwickelten verschiedene Mechanismen, um das schädigende Agens zu eliminieren. Dabei spielen neben Antibiotika abbauenden Enzymen und der Möglichkeit, die Zellpermeabilität zu verändern vor allem auch so genannte Efflux-Pumpen eine bedeutende Rolle. Diese transportieren das in die Bakterienzelle eingedrungene Antibiotikum umgehend wieder aus der Zelle heraus (Glick 2005, Slavkin 1997).

Da gerade in der Zahnheilkunde zusätzlich auch antiseptische Lösungen, allen voran das Chlorhexidin, Verbreitung finden, stellt sich die Frage, ob auch diese der Resistenz-Problematik unterworfen sind.

Verschiedene Autoren berichten über eine verminderte Empfindlichkeit bestimmter Bakterienspezies bei exzessivem Gebrauch antimikrobieller Substanzen, wie Chlorhexidin, Triclosan und quarternären Ammoniumverbindungen. Da diese Mikroorganismen häufig auch gegenüber verschiedenen Antibiotika resistent sind, scheint es eine genetische Verbindung zwischen beiden Phänomenen zu geben (Levy 2000, Fraise 2002, Köljalg et al. 2002). Neben der Änderung der Zellwandpermeabilität macht Russell (2000) ebenfalls aktive Efflux-Pumpen für die unspezifische Resistenzentwicklung verantwortlich. Diese membranständigen Proteine konnten bisher bei zahlreichen grampositiven und gramnegativen Spezies nachgewiesen werden, wobei man zwischen substanzspezifischen Pumpen und so genannten Multi-drug-Efflux-Mechanismen unterscheiden muss. Während die genetische Information

für letztere vorrangig im Bakterienchromosom vorliegt, befinden sich die Gene für die spezifischen Efflux-Pumpen meistens auf Plasmiden, welche extrachromosomale DNA-Abschnitte darstellen (Poole 2005).

Speziell für Chlorhexidin konnten jedoch bisher bei einer Reihe von untersuchten Bakterienstämmen die vermuteten Efflux-Gene nicht nachgewiesen werden (Poole 2005).

3. Zielstellung

Mundspüllösungen werden seit vielen Jahren unterstützend in der Parodontitistherapie angewendet. Hierbei gelten Lösungen mit Chlorhexidindiglukonat als „Goldstandard“, da sie sich durch ihre starke antimikrobielle Wirksamkeit und eine hohe Substantivität auszeichnen. Aus der Vielzahl an Chlorhexidinpräparaten, die heute auf dem Markt angeboten werden, muss der Zahnarzt für seine Behandlung das Produkt auswählen, welches am effektivsten gegen parodontopathogene Keime wirkt.

Erstes Ziel dieser In-vitro-Studie war es daher, die antimikrobielle Wirksamkeit einiger kommerziell erhältlicher Mundspüllösungen mit und ohne CHX-Zusatz mit der von selbst hergestellten Chlorhexidinzubereitungen zu vergleichen. Dreizehn aerobe und fünfzehn anaerobe bzw. mikroaerophile orale Bakterienspezies, darunter auch mehrere Stämme von *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans*, sollten dafür eine Minute lang mit dem jeweiligen Präparat inkubiert und ihr Wachstumsverhalten über einen Zeitraum von 18 h beobachtet werden. Dieser Versuchsansatz diente auch dazu, herauszufinden, ob sich die in der Literatur beschriebene Überlegenheit des Biguanids gegenüber chlorhexidinfreien Antiseptika bestätigt.

Es ist erwiesen, dass der exzessive Gebrauch von Antibiotika und anderen Chemotherapeutika zu einer verringerten Empfindlichkeit der Zielorganismen führen kann. In einem weiteren Teil der Studie galt es, daher der Frage nachzugehen, ob eine dauerhafte Einwirkung desinfizierender Lösungen eine Resistenzentwicklung ausgewählter Mikroorganismen fördert. Dafür wurden die Bakterienstämme über 50 Passagen auf Agarplatten mit subinhibitorischen Konzentrationen von Chlorhexidin, Meridol und Listerine kultiviert und die minimalen Hemmkonzentrationen jeweils zu Beginn, nach der Hälfte und am Ende der Passagen bestimmt. Die anschließende Auswertung der MHK-Werte sollte Aufschluss über das Verhalten der untersuchten Spezies sowie eine eventuelle Resistenzentstehung geben.

Für den Fall der Beobachtung einer Resistenzentwicklung könnte dann in einem weiteren Versuchsansatz mit Hilfe des Pflanzenalkaloids Reserpin die Existenz von Efflux-Pumpen als Ursache für die Adaptation der Bakterien bewiesen oder aber ausgeschlossen werden.

4. Material und Methoden

Im Rahmen dieser In-vitro-Studie wurden zwei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt:

- I. Untersuchung des Wachstumsverhaltens ausgewählter Bakterienstämme nach kurzzeitiger Einwirkung von Mundspüllösungen
- II. Beobachtung einer Resistenzentwicklung bei langfristiger Einwirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Chlorhexidin, Meridol und Listerine und Versuch des Nachweises eines Efflux-Mechanismus mittels Reserpin

4.1 Bakterienstämme

Für beide Versuchsreihen wurden jeweils die gleichen Bakterienstämme verwendet. Es handelte sich dabei um Referenzstämme und Patienten-Isolate, welche im Institut für Medizinische Mikrobiologie verfügbar waren. Die Referenzstämme stammten ursprünglich aus der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig.

Ausgewählt wurden in erster Linie Spezies, die einen mehr oder weniger starken Einfluss bei der Pathogenese parodontaler Erkrankungen haben sowie einige weitere in der Mundhöhle vorkommende Mikroorganismen, bei denen die Wirkungen im Vergleich getestet werden sollten. Folgende Stämme wurden in die Untersuchungen einbezogen:

a) **aerobe** Bakterien:

Streptokokken:	<i>S. intermedius</i> M5-1-2	(Patienten-Isolat)
	<i>S. intermedius</i> M9-3-4	(Patienten-Isolat)
	<i>S. constellatus</i> ATCC 27823	(Referenzstamm)
	<i>S. constellatus</i> IL41b	(Patienten-Isolat)
	<i>S. constellatus</i> IL12b	(Patienten-Isolat)
	<i>S. sanguinis</i> IL108a	(Patienten-Isolat)
	<i>S. oralis</i> J14-1/02	(Patienten-Isolat)
	<i>S. oralis</i> J16/02	(Patienten-Isolat)
	<i>S. oralis</i> M9-3-3	(Patienten-Isolat)

	<i>S. salivarius</i> ATCC 7073	(Referenzstamm)
Sprosspilze:	<i>Candida albicans</i> ATCC 76615	(Referenzstamm)
Enterobakterien:	<i>Enterobacter cloacae</i> JGr1	(Patienten-Isolat)
	<i>Klebsiella oxytoca</i> JGr2	(Patienten-Isolat)

b) **anaerobe** Bakterien:

Porphyromonas gingivalis:	<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	(Referenzstamm)
	<i>P. gingivalis</i> D5-2-2	(Patienten-Isolat)
	<i>P. gingivalis</i> J361-1	(Patienten-Isolat)
	<i>P. gingivalis</i> J362-1	(Patienten-Isolat)
	<i>P. gingivalis</i> J374-1	(Patienten-Isolat)
	<i>P. gingivalis</i> J378-1	(Patienten-Isolat)
	<i>P. gingivalis</i> J435-1	(Patienten-Isolat)
	<i>P. gingivalis</i> M5-1-2	(Patienten-Isolat)
Fusobacterium nucleatum:	<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	(Referenzstamm)

c) **mikroaerophile** Bakterien:

Aggregatibacter		
actinomycetemcomitans:	<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384	(Ref.stamm)
	<i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4	(Referenzstamm)
	<i>A. actinomycetemcomitans</i> MJ22	(Patienten-Isolat)
	<i>A. actinomycetemcomitans</i> MJ26	(Patienten-Isolat)
	<i>A. actinomycetemcomitans</i> MJ95	(Patienten-Isolat)
	<i>A. actinomycetemcomitans</i> MJ96	(Patienten-Isolat)

Vor Versuchsbeginn mussten alle Stämme jeweils am Vortag frisch auf eine Platte mit dem entsprechenden Nährmedium überimpft werden. Als solches wurde für die anaeroben und mikroaerophilen Bakterien Schaedler-Agar mit 8% Schafblut (Fa. Oxoid, Basingstoke, England) und für die aerob wachsenden, mit Ausnahme von *C. albicans*, einfacher Blutagar (Fa. Oxoid) verwendet. Hefepilze benötigen für das Wachstum einen speziellen Nährboden. Aus diesem Grund wurde für die Anzüchtung von *C. albicans* Sabouraudagar (Fa. Oxoid) verwendet. Anschließend kamen die Mikroorganismen in einen Inkubator (Fa. Haereus, Hanau, Deutschland), wo sie bei 5%iger CO₂-Atmosphäre und 37°C kultiviert wurden. Bei *P.*

gingivalis und F. nucleatum erfolgte dieser Prozess unter anaeroben Bedingungen, die mit Hilfe des Anaerogen®-Systems (Fa. Oxoid) hergestellt wurden.

4.2 Mundspüllösungen

Innerhalb dieser Studie wurden neben kommerziell erhältlichen und individuell hergestellten Chlorhexidinlösungen auch die Präparate Meridol und Listerine (Geschmacksrichtung: Freshmint) getestet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Untersuchte Mundspüllösungen

Hersteller	Handelsname	% CHX- Zubereitung
GlaxoSmithKline Consumer Healthcare	Chlorhexamed	0,06%ige Lösung
GlaxoSmithKline Consumer Healthcare	Chlorhexamed®- FLUID 0,1%	0,1%ige Lösung
GlaxoSmithKline Consumer Healthcare	Chlorhexamed- GEL 1%	1%iges Gel
Curaden AG	Curasept® ADS 212	0,12%ige Lösung
Curaden AG	Curasept® ADS 220	0,2%ige Lösung
Oral B	Oral B Chlorhexidin	0,12%ige Lösung
Pfizer	Listerine	
GABA	Meridol	
GABA	Meridol® Chlorhexidin 0,2% Mundspüllösung	0,2%ige Lösung
ohne	Chlorhexidin 0,06%	0,06%ige Lösung
ohne	Chlorhexidin 0,12%	0,12%ige Lösung
ohne	Chlorhexidin 0,2%	0,2%ige Lösung
ohne	Chlorhexidin 1%	1%ige Lösung

Während für die Untersuchungen zum Wachstumsverhalten (Versuchsreihe I) alle oben aufgeführten Präparate zum Einsatz kamen, wurden im Versuchsteil II nur die Agenzien Meridol, Listerine und Chlorhexidin ohne Zusatzstoffe getestet. Für letzteres diente 20%iges Chlorhexidindigluconat als Ausgangssubstanz, welches mit Aqua dest. auf die jeweils benötigten Konzentrationen verdünnt werden musste.

4.3 Versuchsreihe I - Wachstumsverhalten nach kurzzeitiger Einwirkung von Mundspüllösungen

Bei diesem Versuchsteil sollte eine einmalige Mundspülung mit einer antimikrobiellen Lösung von einer Minute Dauer imitiert und das Wachstumsverhalten der Mikroorganismen nach 1 h, 6 h und 18 h beurteilt werden.

4.3.1 Versuchsvorbereitungen

Zu Beginn des Versuches wurden zunächst sterile Reagenzröhrchen mit dem Namen des jeweiligen Stammes und der zugesetzten Testsubstanz sowie deren Konzentration gekennzeichnet. Auf die gleiche Weise wurde eine analoge Anzahl steriler Eppendorfgefäße markiert. Um vergleichbare Werte zu erhalten, ist für jeden Stamm eine Kontrolle mitgeführt worden, die keine Mundspüllösung enthielt (K). Weiterhin erfolgte die Beschriftung von vorbereiteten Agarplatten, die je nach untersuchtem Bakterienstamm das entsprechende Nährmedium enthielten. Dazu wurde folgendes Schema verwendet (Abb. 1):

A. a. Y4	A. a. Y4	A. a. Y4	A. a. Y4	A. a. Y4
CHX 0,2%	CHX 0,2%	CHX 0,2%	CHX 0,2%	CHX 0,2%
K	0 h	1 h	6 h	18 h

Abb. 1: Beschriftungsschema der Agarplatten am Beispiel des Stammes *A. actinomycetemcomitans* Y4 und der individuell hergestellten CHX-Lösung 0,2%

Für jeden untersuchten Stamm wurden also pro Antiseptikum fünf Agarplatten benötigt.

Während die kommerziellen antiseptischen Lösungen bereits gebrauchsfertig waren, mussten die reinen Chlorhexidinzubereitungen erst hergestellt werden. Dazu wurde 20%iges Chlorhexidindiglukonat verwendet, welches mit Aqua dest. jeweils auf die gewünschte Konzentration verdünnt und in einem Becherglas bereitgestellt wurde.

4.3.2 Einstellen der Bakteriendichte

Um in den Versuchsansätzen mit annähernd gleichen Keimkonzentrationen arbeiten zu können, musste zunächst deren Dichte eingestellt werden. Dazu wurden die am Vortag frisch überimpften Stämme mittels eines Wattestäbchens in Röhrchen gegeben, die 8 ml PBS enthielten. Die so hergestellten Bakteriensuspensionen wurden im Vergleich mit standardisierten Röhrchen auf eine Trübung MacFarland Standard 2 eingestellt. Dieser Standard entspricht einer Keimmenge von ca. 5×10^8 /ml. Den Suspensionen, deren Dichte vom Referenzröhrchen abwich, musste entweder PBS oder Bakterien zugegeben werden, bis alle eine annähernd gleich starke Trübung aufwiesen.

4.3.3 Versuchsablauf

Um eine mögliche Kontamination der Materialien zu vermeiden, erfolgte die Durchführung der nachfolgenden Arbeitsschritte unter der Laminarbox.

In die vorbereiteten Reagenzröhrchen wurden je 5 ml Nährbouillon pipettiert. Dabei handelte es sich im Einzelnen um:

Schaedler-Bouillon + Vitamin K (5 µg/ml):	Anaerobier/mikroaerophile Bakterien
Müller-Hinton-Bouillon (Fa. Oxoid):	Aerobier
Sabouraud-Bouillon (Fa. Oxoid):	C. albicans.

Diese Röhrchen wurden in einem Ständer, geordnet nach Stamm und Testsubstanz, bereitgestellt.

Inzwischen wurde von den auf die entsprechende Dichte eingestellten Keimsuspensionen je 1 ml in die zuvor beschrifteten Eppendorftubes gegeben und diese anschließend bei 14000 U/min 3 min lang zentrifugiert (Zentrifuge 5415R, Eppendorf). Nach dem Absaugen der Überstände erfolgte die Zugabe von 200 µl der Testsubstanz. Bei den Kontrollen ist anstelle des Agens 200 µl destilliertes Wasser zugegeben worden. Die verschlossenen Tubes kamen danach für 1 min in den Brutschrank, wo sie einer Temperatur von 37°C und einem Gehalt von 5% CO₂ ausgesetzt waren. Nach der Entnahme schloss sich eine weitere dreiminütige

Zentrifugation bei 14000 U/min an. Nachdem die Überstände durch Absaugen entfernt worden waren, erfolgte die Zugabe von 200 µl Nährbouillon aus den vorbereiteten Röhrchen zu den sedimentierten Bakterien entsprechend der Kennzeichnung. Der nächste Arbeitsschritt bestand in der Durchmischung von Bouillon und Mikroorganismen, indem mittels einer Pipette mehrmals angesaugt und gespült wurde. Mit dem letzten Ansaugen wurde der gesamte Inhalt der Tubes zurück in das jeweilige Reagenzröhrchen pipettiert.

Um einen Anfangswert zu erhalten, wurde als nächstes für jeden Stamm ein weiteres Eppendorfgefäß bereitgestellt. In jedes Tube erfolgte die Zugabe von 10 µl der stammspezifischen Bouillon (Kontrolle) sowie 990 µl PBS. Nach dem Durchmischen mit dem Vortexgerät (Vortex Genie 2, Scientific Industries) wurden von diesen Suspensionen je 100 µl auf den vorbereiteten Agarplatten ausgespatelt. Der gleiche Vorgang wiederholte sich bei den Kontrolllösungen nach 1 h, 6 h und 18 h. Bei den Röhrchen, die die Bakterien enthielten, welche den Testsubstanzen ausgesetzt waren, wurden zu denselben Zeitpunkten (mit Ausnahme des Anfangswertes) jeweils 100 µl entnommen und ohne vorherige Verdünnung mit PBS ebenfalls ausgespatelt.

Die so bestückten Agarplatten kamen danach in den Brutschrank und wurden bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre 5 Tage lang inkubiert, wobei dies bei den Anaerobiern wiederum unter Sauerstoffentzug erfolgen musste.

Die Auswertung fand nach 5 Tagen statt. Aus der Zahl der Kolonie bildenden Einheiten (KBE), welche durch Auszählen auf den Platten ermittelt wurde, ergaben sich Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten der Bakterien und somit auf die Effektivität der ausgewählten Antiseptika.

4.4 Versuchsreihe II - Untersuchungen zur Resistenzentwicklung nach längerer Einwirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Chlorhexidin, Meridol und Listerine

4.4.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Unter Anwendung des Agardilutionstestes (Abb. 2) konnte für jeden Keim die minimale Hemmkonzentration gegenüber den antibakteriellen Agenzien ermittelt werden. Dafür wurden zunächst Agarplatten hergestellt, die neben dem jeweiligen Nährmedium auch die entsprechende Testsubstanz in aufsteigender Konzentration enthielten (0,01%-50% für Meridol/Listerine; 0,0001%-1% für CHX). Die Einstellung der gewünschten Endkonzentration erfolgte wiederum durch Vorverdünnung der Antiseptika mit Aqua dest. bzw. durch Variation des Agar-Anteils, wobei am Ende jede Platte mit 20 ml Agar-Wirkstoffgemisch bestückt wurde. Mit dem Gerät Multipoint-Inoculator (AM80 Automatic Inoculator, Denley-Tech Ltd.) konnten die Petrischalen anschließend mit allen Bakterienstämmen gleichzeitig beimpft werden, es mussten jedoch aerobe und anaerobe/mikroaerophile Bakterien aufgrund ihrer unterschiedlichen Nährmedien separat untersucht werden. Dabei wurde eine stets gleiche Menge an Keimsuspension (1 μ l) mit Hilfe der Nadeln des Gerätes auf den Agar aufgebracht. Bei jedem Durchlauf zur Bestimmung der MHK wurde eine Platte ohne Zusatz als Kontrolle mitgeführt. Nach ca. 5 Tagen Inkubation im Brutschrank konnten die MHK-Werte bestimmt werden.

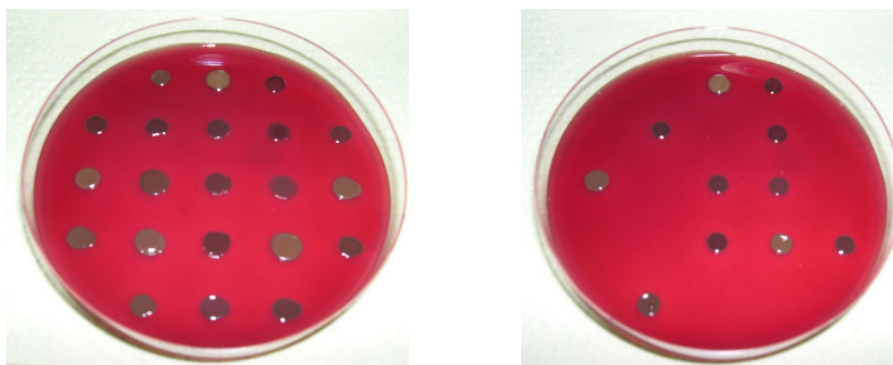


Abb. 2: Agardilutionstest; links: Wachstumskontrolle; rechts: Wachstum bei 0,05% CHX- Zusatz

4.4.2 Passagieren der Stämme

Um eine mögliche Resistenzentwicklung beobachten zu können, wurden die Stämme anschließend 50 mal auf Agarplatten passagiert, die subinhibitorische Konzentrationen von Meridol, Listerine und Chlorhexidin ohne Zusatzstoffe enthielten. Dafür mussten zunächst Platten hergestellt werden, denen neben dem entsprechenden Agar ca. $\frac{1}{4}$ der MHK an Testsubstanz zugesetzt wurde. Da sich die Werte bei den einzelnen Stämmen zum Teil deutlich unterschieden, sind dafür Konzentrationen ausgewählt worden, die auch die empfindlichsten Bakterienstämme berücksichtigten. So ergaben sich für die aeroben Keime Plattenkonzentrationen von 1% Meridol/Listerine sowie 0,02% CHX und bei den Anaerobiern/Mikroaerophilen 0,5% Meridol/Listerine und 0,002% CHX. Die Einstellung des gewünschten Agar-Wirkstoffverhältnisses erfolgte wiederum durch Vorverdünnung der Antiseptika mit Aqua dest., wobei auch hier alle Platten mit 20 ml Agar bestückt wurden. Diese entsprechend gekennzeichneten Petrischalen wurden vorrätig im Kühlraum bereitgestellt.

Vor Versuchsbeginn mussten die Stämme am Vortag ebenfalls frisch auf Agarplatten überimpft und im Brutschrank bei 37°C inkubiert werden. Bei *P. gingivalis* und *F. nucleatum* erfolgte die Anzüchtung wiederum anaerob unter Verwendung des Anaerogen®-Systems.

Nach der Entnahme aus dem Inkubator wurden die Bakterien auf die Platten mit den zugesetzten Agenzien passagiert, nachdem diese zuvor mit den Namen der Keime beschriftet worden waren. Immer vier Stämme fanden dabei auf einer Agarplatte Platz. Diese kamen im Anschluss wieder in den Brutschrank. Die Passagen wiederholten sich im Abstand von 2-3 Tagen.

Die MHK wurde nach 25 und 50 Passagen erneut mittels Agardilution bestimmt und mit den Anfangswerten verglichen.

4.4.3 Versuch des Nachweises eines Efflux-Mechanismus mittels Reserpin

Bei einigen Bakterienstämmen konnte während der im Versuchsteil II durchgeführten Passagen eine temporäre Erhöhung der MHK beobachtet werden. Hinter diesem Phänomen wurde zunächst ein Efflux-Mechanismus vermutet. Mit dem Antisymphotonikum Reserpin, welches die Aktivität der membranständigen Efflux-Pumpen hemmt, sollte geprüft werden, ob diese Art der Resistenzentwicklung zu Grunde lag.

Im Rahmen dieses Versuches sind exemplarisch vier aerobe und sechs anaerobe/mikroaerophile Stämme getestet worden, bei denen sich die MHK am Ende der 50 Passagen um mehrere Stufen erhöht hatte:

a) **aerob:** *S. constellatus* IL41b
 S. salivarius ATCC 7073
 S. oralis J14-1/02
 Klebsiella oxytoca JGr2

b) **anaerob/mikroaerophil:** *P. gingivalis* J361-1
 P. gingivalis ATCC 33277
 P. gingivalis J435-1
 A. actinomycetemcomitans Y4
 A. actinomycetemcomitans ATCC 33384
 F. nucleatum ATCC 25586

Verwendet wurden für diese Untersuchungen die Bakterienkulturen, die am Ende der 50 Passagen (Versuchsteil II) vorlagen. Zunächst mussten pro Keim und Testsubstanz zwei sterile Reagenzröhrchen beschriftet und mit 5 ml der entsprechenden Nährbouillon bestückt werden. Für jeden Stamm wurden zwei weitere Röhrchen als Kontrolle mitgeführt. Die Vorkultur und Dichteeinstellung der Bakterien erfolgte analog dem Versuchsteil I. Des Weiteren wurde eine den Reagenzröhrchen entsprechende Anzahl an sterilen Eppendorfgläsern vorbereitet und mit je 1ml Bakteriensuspension befüllt. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 14000 U/min mussten die Überstände abgesaugt werden. Im Anschluss wurden die sedimentierten Bakterien mit je 200 µl der jeweiligen Bouillon aus den Reagenzröhrchen versehen, gemischt und der gesamte Inhalt in diese zurück pipettiert. Zu

einem der beiden Reagenzgefäße (je Stamm und Agens) erfolgte im nächsten Arbeitsschritt die Zugabe von 10 mg/l Reserpin, welches zuvor in Aqua dest. aufgelöst werden musste. Beiden Röhren wurde anschließend $\frac{1}{4}$ der MHK (Werte nach Ende der 50 Passagen) an Testsubstanz zugesetzt. Dabei handelte es sich um folgende Konzentrationen: CHX 0,001%; Meridol 5% und Listerine 10%. Hieraus ergab sich folgendes Pipettierschema:

CHX 0,001%:

1. Röhren: 5 ml Bouillonkultur + 60 μ l CHX (0,1%ig) + 940 μ l PBS
2. Röhren: 5 ml Bouillonkultur + 60 μ l CHX (0,1%ig) + 880 μ l PBS + 60 μ g Reserpin

Meridol 5%:

1. Röhren: 5 ml Bouillonkultur + 300 μ l Meridol + 700 μ l PBS
2. Röhren: 5 ml Bouillonkultur + 300 μ l Meridol + 640 μ l PBS + 60 μ g Reserpin

Listerine 10%:

1. Röhren: 5 ml Bouillonkultur + 600 μ l Listerine + 400 μ l PBS
2. Röhren: 5 ml Bouillonkultur + 600 μ l Listerine + 340 μ l PBS + 60 μ g Reserpin

Kontrolle:

1. Röhren: 5 ml Bouillonkultur + 1000 μ l PBS
2. Röhren: 5 ml Bouillonkultur + 940 μ l PBS + 60 μ g Reserpin

Die so befüllten Reagenzgefäße wurden verschlossen und kamen anschließend in den Brutschrank. Bei den aerob wachsenden Bakterien betrug die Inkubationszeit 3 h und bei den anaerob/mikroaerophil wachsenden Stämmen 6 h, wobei die Anzucht der Anaerobier auch hier unter Sauerstoffentzug erfolgen musste. Nach Ablauf dieser Zeiten wurde den Röhren jeweils 100 μ l Bouillonkultur entnommen und auf entsprechenden Agarplatten ausgespatelt. Diese kamen dann erneut in den Brutschrank.

Nach 5 Tagen konnten die KBE ausgezählt und somit Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten der Bakterien unter Reserpin-Einwirkung gezogen werden.

4.5 Anfertigung von REM-Aufnahmen ausgewählter Stämme

Zum Abschluss der Studie sollten zur Veranschaulichung der Effekte von Chlorhexidin an der Zellwand von Bakterien Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) angefertigt werden. Hierfür wurden die Stämme *P. gingivalis* M5-1-2, *F. nucleatum* ATCC 25586, und *S. constellatus* IL12b sowie die individuell zubereitete 1%ige CHX-Lösung untersucht. Des Weiteren sollten jeweils auch Kontrollaufnahmen ohne den Zusatz des Antiseptikums gemacht werden.

Zunächst mussten auch hier wieder die ausgewählten Stämme frisch passagiert werden. Eine 24-Well-Gewebekulturplatte (Fa. Greiner®) wurde im Anschluss mit 12 Glasplättchen bestückt (4 Stück pro Stamm). Es folgte die Beschichtung der Plättchen mit 250 µl verdünntem Poly-L-Lysin, um eine bessere Benetzbarkeit zu erreichen.

Am darauf folgenden Tag wurden die frischen Keime in Röhrchen mit Aqua dest. geimpft. MacFarland 1 diente als Standard zur Einstellung der Suspensionsdichte, was einer Zahl von ca. 3×10^8 Mikroorganismen pro ml entspricht. Nach dem Absaugen des Poly-L-Lysins aus der Well-Platte ist jedes Glasplättchen mit 100 µl Keimsuspension versehen worden. Nach einer Ruhephase von 10 min unter der Laminarbox erfolgte die Zugabe von jeweils 250 µl der zuvor hergestellten CHX-Lösungen bzw. Aqua dest. bei den Kontrollen. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei 37°C wurden die Lösungen abgesaugt und die Glasplättchen zwei Mal vorsichtig mit je 1 ml Aqua dest. gewaschen. Es schloss sich die Fixierung der Stämme mit 2%iger Glutaraldehydlösung an. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1molarem Cacodylatpuffer wurden die Plättchen in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

Die Kritischpunkttrocknung und die anschließende Herstellung der REM-Aufnahmen erfolgte im Zentrum für Elektronenmikroskopie der FSU Jena.

5. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Resultate beider Versuchsreihen zusammenfassend dargestellt und erläutert.

5.1 Versuchsreihe I mit kurzzeitiger Einwirkung der Mundspüllösungen

Mit diesem Teil der In-vitro-Studie konnte gezeigt werden, dass sich die untersuchten Präparate in ihrer Wirkung stark unterschieden. Am besten wurde das Wachstum nahezu aller Stämme mit den individuell hergestellten Chlorhexidinzubereitungen sowie den Fertigprodukten Chlorhexamed-Lösung 0,06%+Fluorid und Chlorhexamed-Gel 1% gehemmt. Die anderen kommerziell erhältlichen Präparate, die den Wirkstoff CHX enthalten, zeigten konzentrationsabhängig eine mehr oder weniger gute antimikrobielle Wirksamkeit. Auf die Lösungen Meridol und Listerine hingegen reagierten die verschiedenen Spezies sehr differenziert, wobei letztere insgesamt überlegen war.

Um zusammenfassende Aussagen treffen zu können, wurden die Ergebnisse in den nachfolgenden graphischen Darstellungen, wenn es sich um mehrere untersuchte Stämme pro Spezies handelte, als arithmetischer Mittelwert angegeben.

5.1.1 *Porphyromonas gingivalis*

Bei der parodontopathogenen Spezies *P. gingivalis* wirkte am besten das Fertigprodukt Chlorhexamed-Lösung 0,06%+Fluorid. Bei sieben von acht untersuchten Stämmen reduzierte sich die Zahl der KBE bereits nach 1 h Inkubation auf Null, beim achten ebenfalls nach 6 h. Auch Listerine und die individuell hergestellte 1%ige Chlorhexidinlösung zeigten einen sehr guten antimikrobiellen Effekt. Mit beiden Präparaten konnten ebenfalls alle Bakterien abgetötet werden. Unabhängig vom Wirkstoff Chlorhexidin und dessen Konzentration ergaben sich für alle anderen untersuchten Mundspüllösungen deutlich schlechtere Ergebnisse hinsichtlich der antiseptischen Wirksamkeit. Mit keinem dieser Agenzien konnte eine Verringerung der Keimzahlen erreicht werden (Abb. 3, Tabellen 2-9 im Anhang).

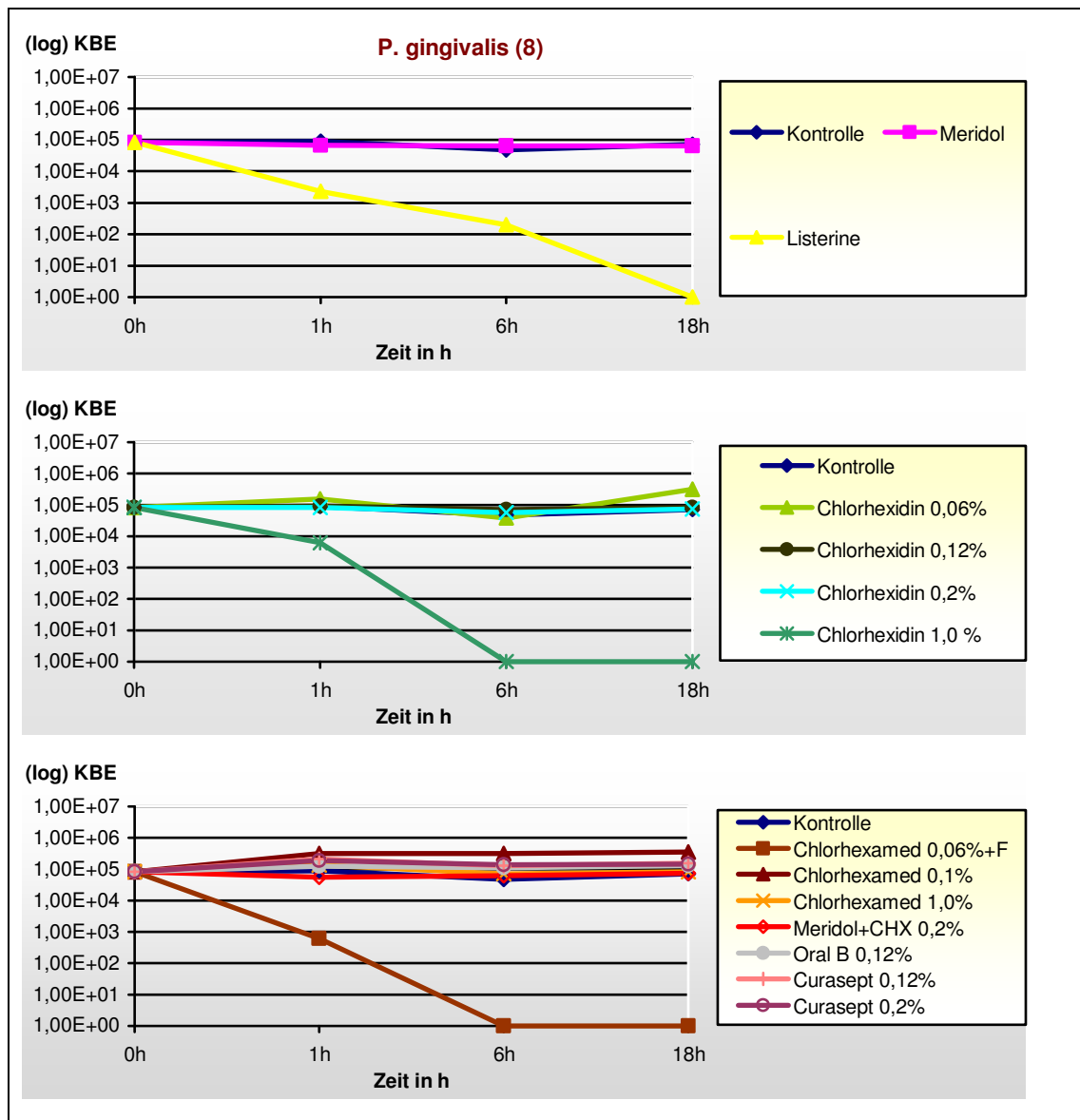


Abb. 3: Wachstumskurven (Mittelwerte) der acht untersuchten *Porphyromonas gingivalis*-Stämme (oben: Lösungen ohne Chlorhexidin; Mitte: individuell hergestellte Chlorhexidin-Lösungen; unten: kommerziell erhältliche Chlorhexidin-Präparate)

5.1.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Bei dieser für die Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis gleichfalls bedeutenden Spezies wurden in die Bewertung die Stämme *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 sowie *A. actinomycetemcomitans* Y4 einbezogen, da die Patienten-Isolate, auch auf der Kontrollplatte, nicht gewachsen waren. Bei allen untersuchten Lösungen lag die Keimzahl nach 18 h unter dem Kontrollwert, allerdings erreichten auch hier nur wenige Präparate eine echte Keimreduktion. Die besten Ergebnisse dieser Versuchsreihe wurden mit der individuell

angemischten 1%igen Chlorhexidinlösung und Chlorhexamed-Gel 1% erzielt, die beide eine vollständige Eliminierung der Mikroorganismen nach 1 h bzw. 6 h bewirkten. Auch die 0,06%ige Chlorhexidinzubereitung zeigte eine sehr gute Wirkung und verminderte die Zahl der KBE bereits nach einer Stunde um zwei log-Stufen. Listerine sorgte als chlorhexidinfreies Agens bei beiden Stämmen nach 18 h für eine Bakterienreduktion um drei Zehnerpotenzen und konnte so ebenfalls einen hervorragenden antiseptischen Effekt nachweisen. Bei allen anderen Präparaten wurde nach einer vorübergehenden Senkung der Zahl Kolonie bildender Einheiten wieder ein mehr oder minder starker Anstieg derselben beobachtet (Abb. 4, Tabellen 10 und 11 im Anhang).

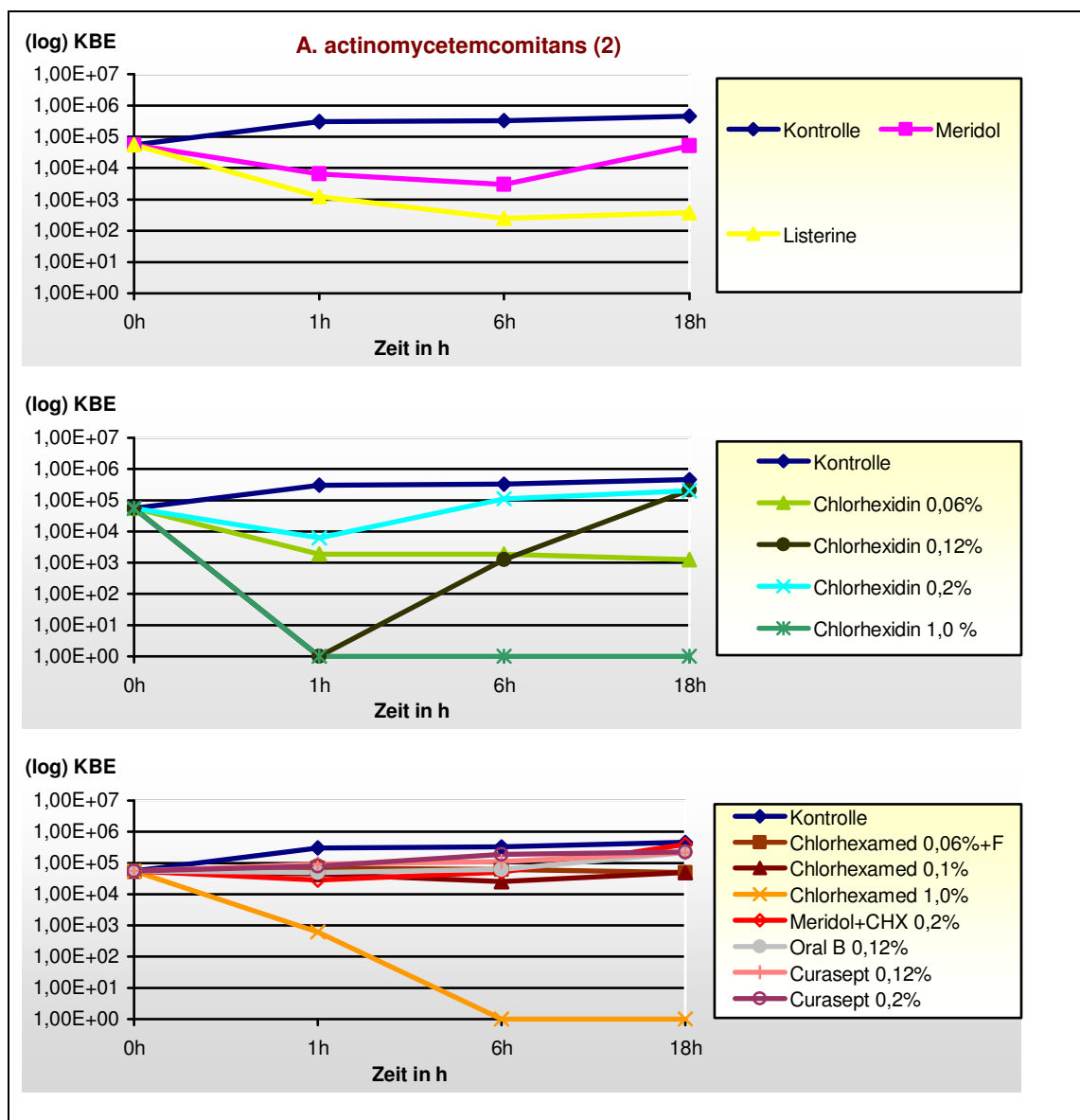


Abb. 4: Wachstumskurven (Mittelwerte) zweier Stämme von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (oben: chlorhexidinfreie Präparate; Mitte: individuell hergestellte Chlorhexidin-Lösungen; unten: kommerziell erhältliche Chlorhexidin-Produkte)

5.1.3 *Fusobacterium nucleatum*

Der Stamm *F. nucleatum* ATCC 25586 reagierte gegenüber den meisten der untersuchten Agenzien sehr empfindlich. Das Wachstum des Bakteriums konnte mit allen individuell hergestellten CHX-Lösungen, mit allen drei Chlorhexamed-Präparaten sowie mit Meridol und Listerine bereits nach 1 h Inkubation vollständig gehemmt werden. Ebenso wurde bei den Produkten Oral B und Meridol+CHX anfangs eine fast vollständige Keimelimination erreicht, nach 18 h betrug die Reduktion immerhin noch zwei log-Stufen. Die schlechtesten Ergebnisse erzielte das Präparat Curasept. Unabhängig von der CHX-Konzentration zeigten beide Lösungen keine antibakterielle Wirkung (Abb. 5, Tabelle 12 im Anhang).

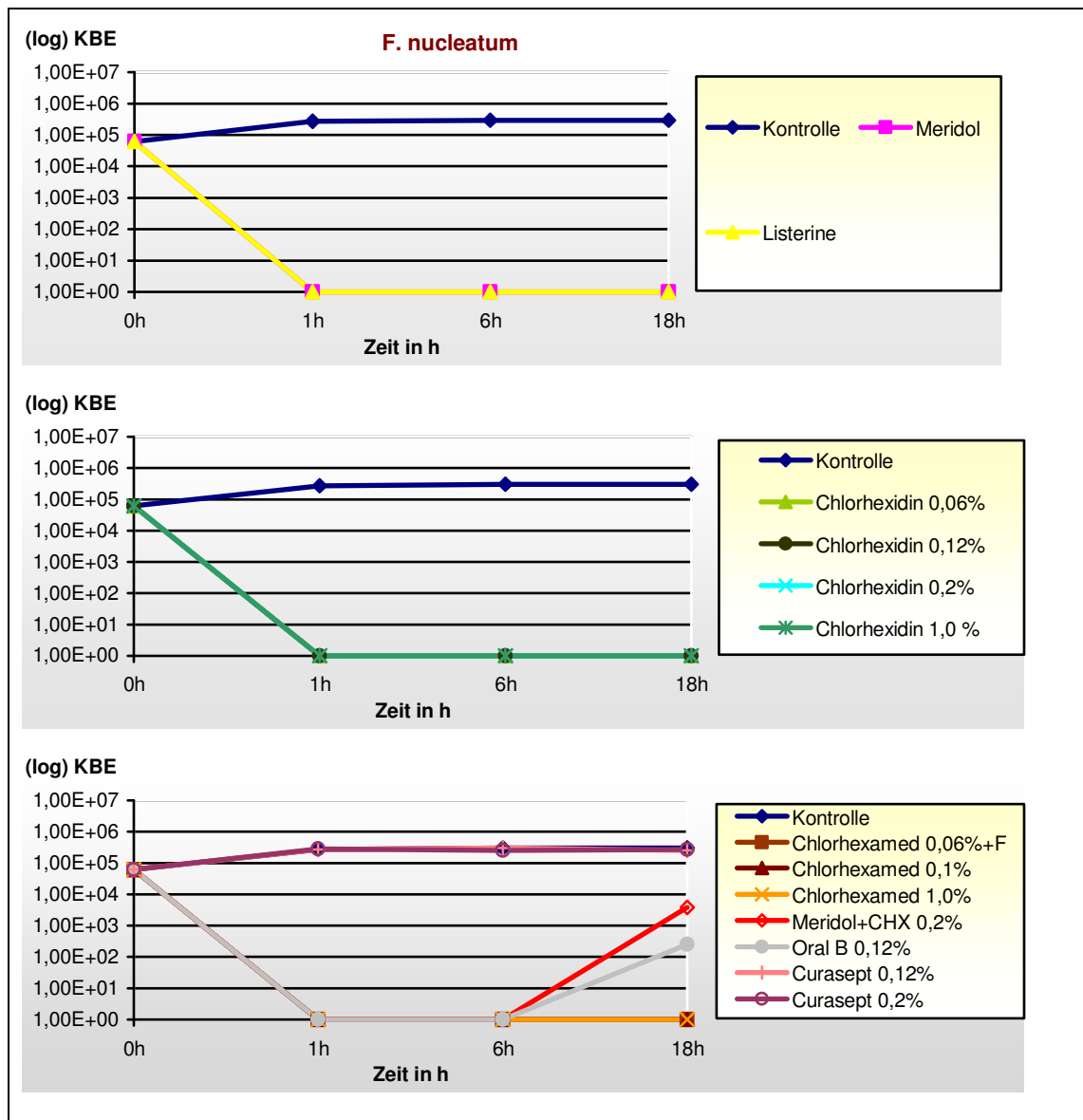


Abb. 5: Wachstumskurven von *F. nucleatum* ATCC 25586 (oben: chlorhexidinfreie Präparate; Mitte: individuelle Chlorhexidinzubereitungen; unten: kommerziell erhältliche CHX-Produkte)

5.1.4 Streptococcus constellatus/ Streptococcus intermedius

In der Versuchsreihe *S. constellatus*/ *S. intermedius* sind die besten antibakteriellen Effekte mit der individuell hergestellten 0,2%igen CHX-Lösung erzielt worden. Bereits nach 1 h Inkubationszeit waren alle untersuchten Stämme nicht mehr nachweisbar. Nach 18 h wurde das Bakterienwachstum auch mit Meridol, Chlorhexamed-Lösung 0,06%+Fluorid und Chlorhexidin 1% vollständig gehemmt. Mit Ausnahme der beiden Curasept-Produkte erzielten die übrigen Agenzien Keimreduktionen zwischen einer log-Stufe (CHX 0,06%) und drei log-Stufen (Oral B) nach 18 h. Curasept verringerte die Keimzahlen wiederum nur minimal (Abb. 6, Tabellen 13-17 im Anhang).

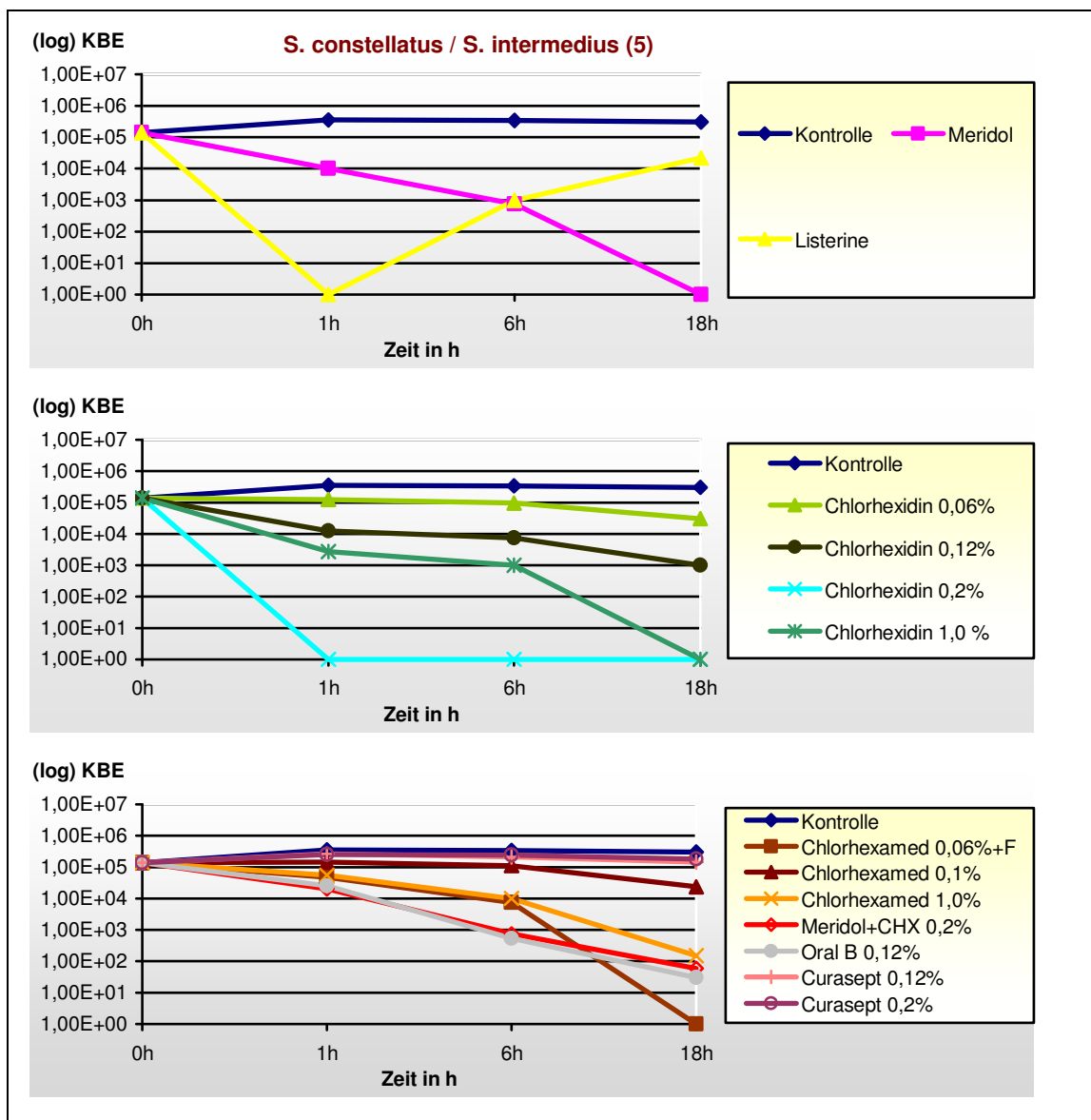


Abb. 6: Wachstumskurven (Mittelwerte) von fünf Stämmen *S. constellatus*/ *S. intermedius* (oben: CHX-freie Präparate; Mitte: individuelle CHX-Zubereitungen; unten: handelsübliche CHX-Produkte)

5.1.5 Orale Streptokokken (*S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. salivarius*)

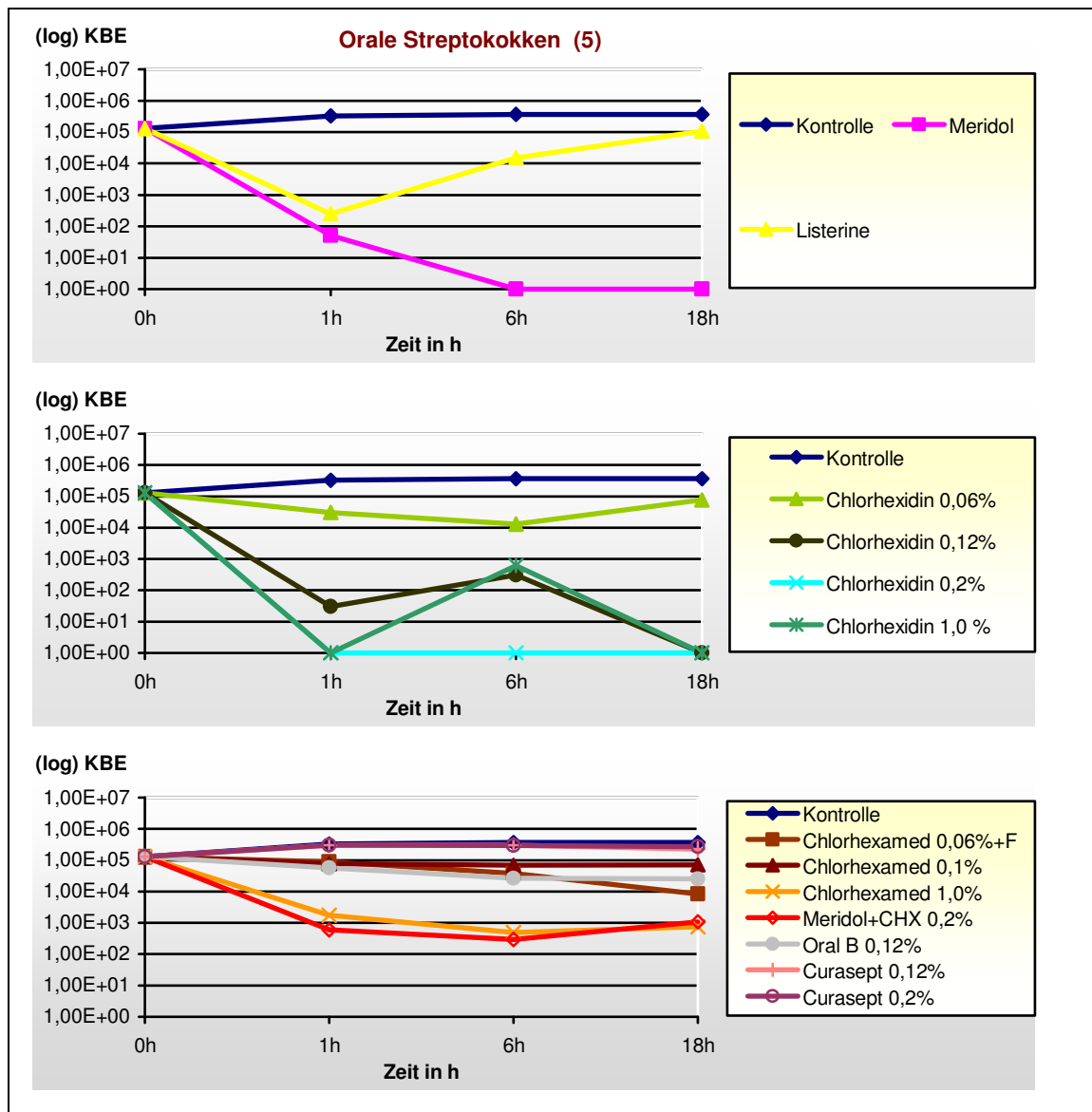


Abb. 7: Wachstumskurven (Mittelwerte) von fünf untersuchten Stämmen der Spezies *Streptococcus sanguinis*, *S. oralis* und *S. salivarius* (oben: chlorhexidinfreie Lösungen; Mitte: individuell zubereitete CHX-Lösungen; unten: kommerziell erhältliche Chlorhexidin-Präparate)

Auch in dieser Gruppe konnte die Mundspüllösung Curasept im Gegensatz zu den anderen Testpräparaten nicht überzeugen. Hier war erneut nur eine sehr geringe Reduktion der KBE feststellbar. Die individuell hergestellten Chlorhexidinlösungen, mit Ausnahme der geringsten Konzentration von 0,06%, reduzierten hingegen das Wachstum aller drei untersuchten Spezies sehr effizient. Nach 18 h Inkubation waren alle Stämme vollständig eliminiert. Meridol und Meridol+CHX wiesen ebenfalls eine sehr gute Wirksamkeit auf, sie senkten die Keimzahl um mindestens zwei log-Stufen. Sehr wirkungsvoll bei der Abtötung der Mikroorganismen zeigte sich auch das Fertigprodukt Chlorhexamed-Gel 1%, mit dem die

KBE um drei Zehnerpotenzen reduziert werden konnten. Nach einer anfänglich deutlichen Verringerung der Bakterienzahl um drei log-Stufen wurde bei Listerine nachfolgend wieder ein starker Anstieg derselben beobachtet. Alle übrigen Lösungen waren weniger wirksam gegenüber den untersuchten Streptokokken, im Durchschnitt reduzierten sie die Keimzahl jedoch immerhin um eine Zehnerpotenz (Abb. 7, Tabellen 18-22 im Anhang).

5.1.6 Enterobakterien (*Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*)

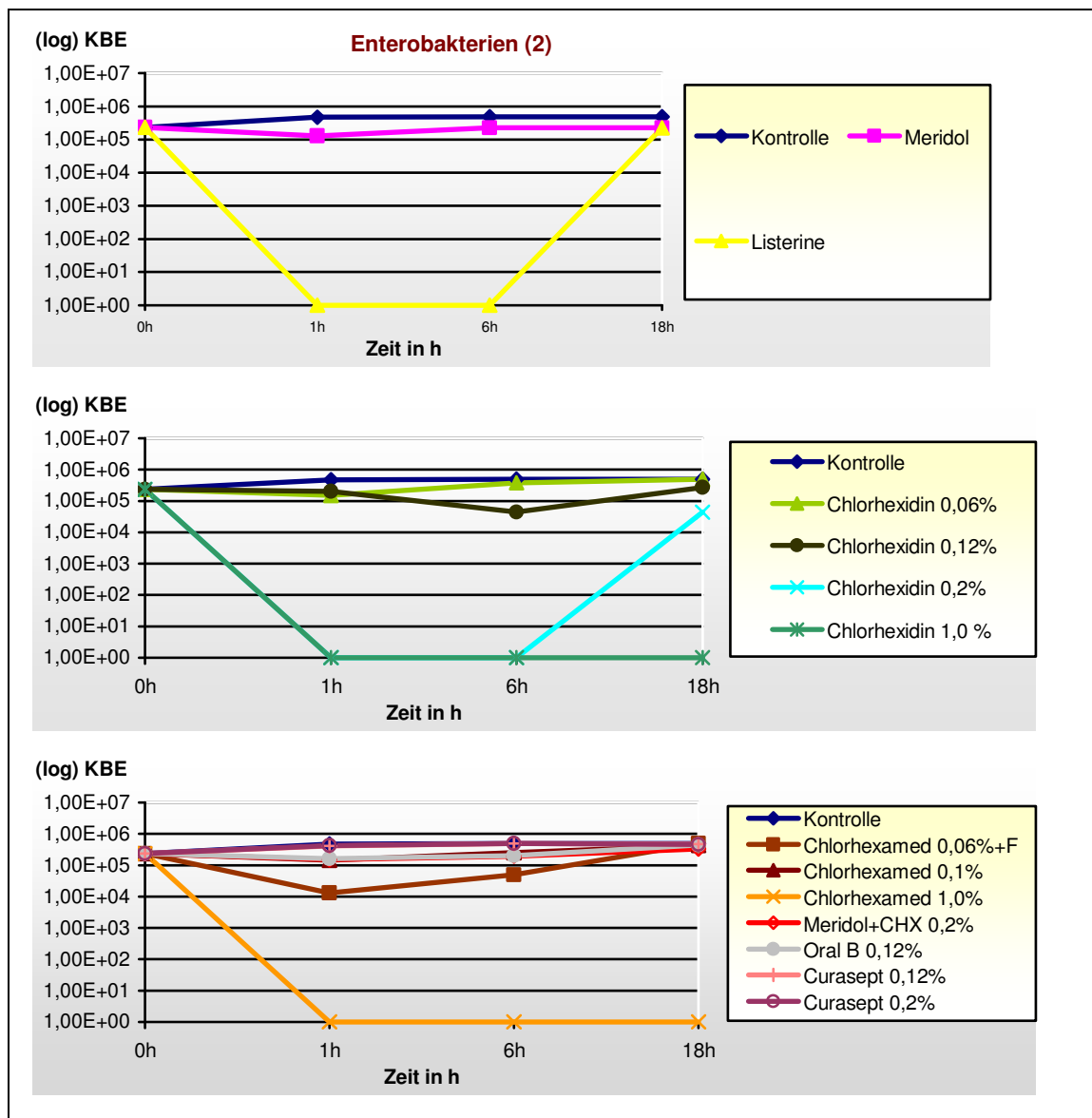


Abb. 8: Wachstumskurven (Mittelwerte) von zwei Stämmen gramnegativer Stäbchen der Spezies *Klebsiella oxytoca* und *Enterobacter cloacae* (oben: chlorhexidinfreie Präparate; Mitte: individuelle Chlorhexidinzubereitungen; unten: handelsübliche CHX-Produkte)

Bei den zwei untersuchten gramnegativen Stäbchen konnte der beste antimikrobielle Effekt mit den beiden 1%igen Chlorhexidin-Präparaten erreicht werden. Sowohl die individuell hergestellte Lösung als auch das Fertigprodukt Chlorhexamed-Gel eliminierten die Bakterien bereits nach 1 h Inkubationszeit vollständig. Kurzzeitig bewirkten auch die Agenzien Chlorhexidin 0,2% und Listerine eine starke Keimreduktion, doch nach 18 h konnte hier wieder eine deutliche Zunahme der KBE beobachtet werden. *K. oxytoca* reagierte insgesamt empfindlicher auf die Lösungen als *E. cloacae*. Bei erstgenanntem Stamm führte auch Meridol nach 1 h zu einer vollständigen Elimination der Bakterien, bei *Enterobacter* hingegen zeigte es keine desinfizierende Wirkung. Bei allen anderen Antiseptika war der antibakterielle Effekt auf beide Stämme deutlich geringer ausgeprägt (Abb. 8, Tabellen 23 und 24 im Anhang).

5.1.7 *Candida albicans*

Beim Hefepilz *Candida albicans* zeigten mit Ausnahme der Chlorhexamed-Lösung 0,06%+ Fluorid und Chlorhexidin 0,06%, wo es zu deutlichen Keimvermehrungen kam, alle Präparate eine gute bis sehr gute antimikrobielle Wirksamkeit. Eine vollständige Elimination der Bakterien konnte bei sechs Produkten bereits nach einer Inkubationszeit von 1 h beobachtet werden. Dabei handelt es sich um Chlorhexamed-Fluid 0,1%, Chlorhexamed-Gel 1%, die selbst hergestellten Chlorhexidinlösungen 0,12% und 0,2%, Listerine und Oral B. Nach 18 h wurden die Mikroorganismen ebenso mit Meridol, Meridol+CHX, Chlorhexidin 1% und Curasept 0,12% komplett abgetötet. Eine Senkung der Zahl Kolonie bildender Einheiten um fast drei log-Stufen konnte auch mit der Lösung Curasept 0,2% nach 18 h erreicht werden (Abb. 9, Tabelle 25 im Anhang).

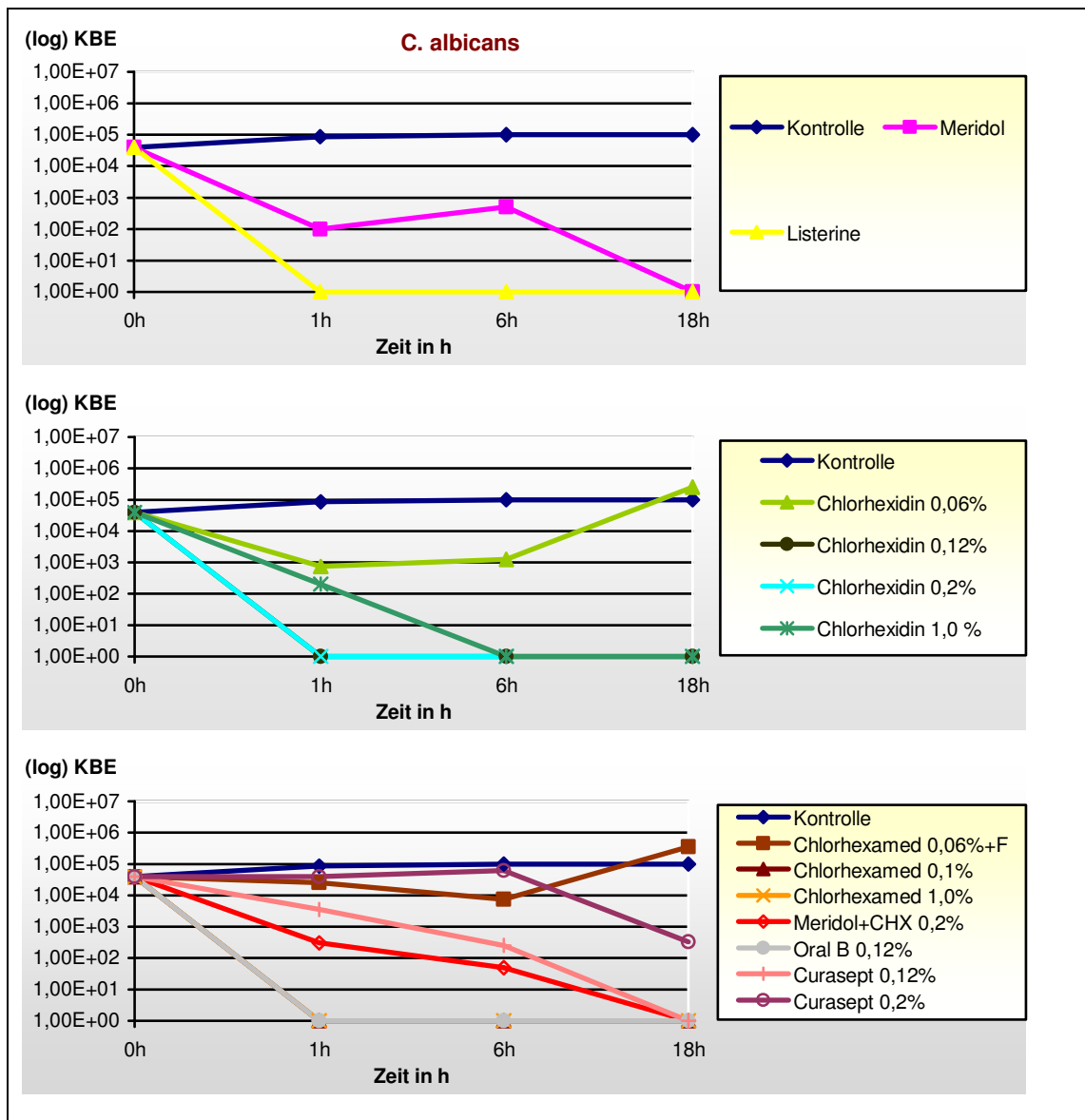


Abb. 9: Wachstumskurven von *Candida albicans* ATCC 76615 (oben: chlorhexidinfreie Lösungen; Mitte: selbst zubereitete Chlorhexidin-Präparate; unten: kommerziell erhältliche CHX-Produkte)

5.2 Versuchsteil II mit langfristiger Einwirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Mundspüllösungen

Dieser Versuchsansatz konnte verdeutlichen, dass einige Bakterienstämme nach längerfristiger Einwirkung subinhibitorischer Konzentrationen von oralen Antiseptika eine gewisse Resistenz zu entwickeln scheinen. Dieser Effekt trat sowohl bei den aeroben als auch anaeroben/mikroaerophilen Spezies gegenüber allen drei untersuchten Lösungen in Erscheinung, wobei die Bakterien erheblich höhere Konzentrationen von Meridol und Listerine tolerierten als von Chlorhexidin. Dieser Aspekt unterstreicht wiederum die sehr gute

antimikrobielle Wirksamkeit des Biguanids. In den meisten Fällen handelte es sich um eine temporäre Erhöhung der minimalen Hemmkonzentration, die oftmals ein Mehrfaches des Ausgangswertes betrug. Bei manchen Stämmen führte die dauerhafte Einwirkung der Agenzien jedoch auch zu einer vollständigen Wachstumshemmung, sodass nicht für alle untersuchten Mikroorganismen nach 25 bzw. 50 Passagen entsprechende MHK-Werte zu ermitteln waren.

5.2.1 Chlorhexidin

Bei den anaeroben/mikroaerophilen Bakterien entwickelten fünf von fünfzehn untersuchten Stämmen eine temporäre Resistenz gegenüber der subinhibitorischen Chlorhexidinkonzentration von 0,002% in den Agarplatten. Die MHK hat sich bei *P. gingivalis* J362-2, *P. gingivalis* J374-1 und *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 nach 25 Passagen verdoppelt. Bei *P. gingivalis* J435-1 erhöhte sich diese um das Fünffache, bei *P. gingivalis* J378-1 sogar um das Zehnfache. Mehrere Stämme, insbesondere der Spezies *A. actinomycetemcomitans*, sind jedoch im Laufe der Passagen eliminiert worden (Abb. 10, Tabelle 26 im Anhang).

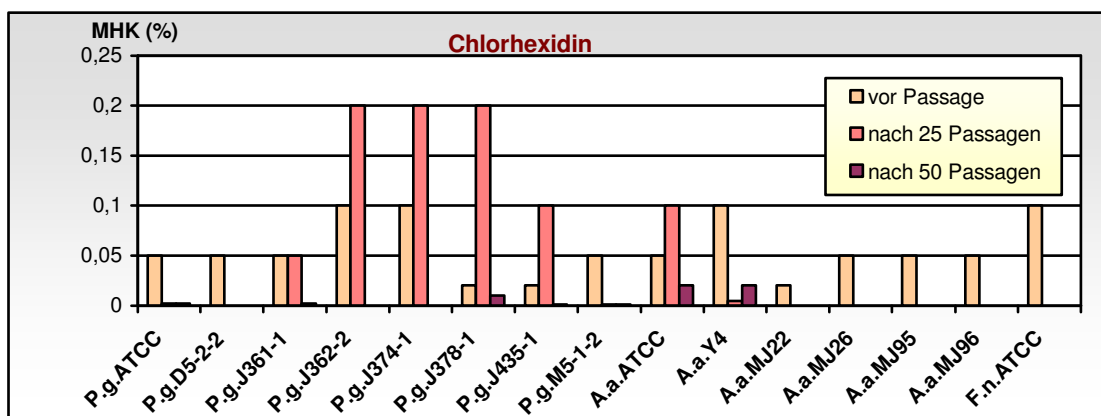


Abb. 10: MHK-Werte der anaeroben/mikroaerophilen Bakterien bei langfristiger Einwirkung subinhibitorischer CHX-Konzentrationen (0,002%)

Drei der aeroben Spezies zeigten ebenfalls eine vorübergehende Erhöhung der MHK-Werte. Bei *S. oralis* M9-3-3 und *C. albicans* ATCC 76615 konnte eine Verdopplung und bei *S. salivarius* ATCC 7073 sogar eine Steigerung um mehr als das Zehnfache des Ausgangswertes festgestellt werden. Auch hier fiel die minimale Hemmkonzentration jeweils am Ende der Passagen wieder ab. Es wurde in dieser Versuchsreihe außerdem deutlich, dass die

untersuchten Aerobier höhere Konzentrationen an Chlorhexidin tolerierten, als die Spezies *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* und *F. nucleatum* (Abb. 11, Tabelle 27 im Anhang).

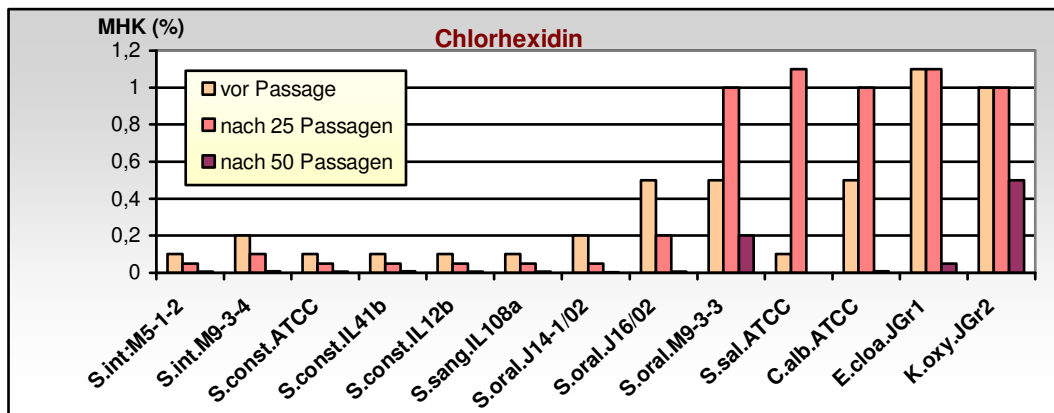


Abb. 11: MHK-Werte der aeroben Mikroorganismen bei langfristiger Einwirkung subinhibitorischer CHX-Konzentrationen (0,02%)

5.2.2 Meridol

Die subinhibitorische Konzentration der Agarplatten betrug bei den Anaerobiern/ Mikroaerophilen 0,5%. Bei acht Bakterienstämmen konnte auch hier eine Zunahme der MHK nach 25 Passagen festgestellt werden, wobei es sich bei fünf dieser Stämme um *P. gingivalis* handelte. Der ATCC-Stamm, *P. gingivalis* J362-2 sowie *P. gingivalis* J374-1 konnten die Werte nach der Hälfte der Passagen verdoppeln, bei letzterem am Ende sogar verfünffachen. Ebenfalls um das Fünffache stieg die minimale Hemmkonzentration bei *P. gingivalis* J361-1, *P. gingivalis* J435-1 und beim *A. actinomycetemcomitans* ATCC- und Y4-Stamm. Auch bei *F. nucleatum* konnte nach 25 Passagen eine Verdopplung des Anfangswertes beobachtet werden. Mit Ausnahme von *P. gingivalis* J374-1 handelte es sich wiederum bei allen Stämmen um einen temporären Effekt (Abb. 12, Tabelle 26 im Anhang).

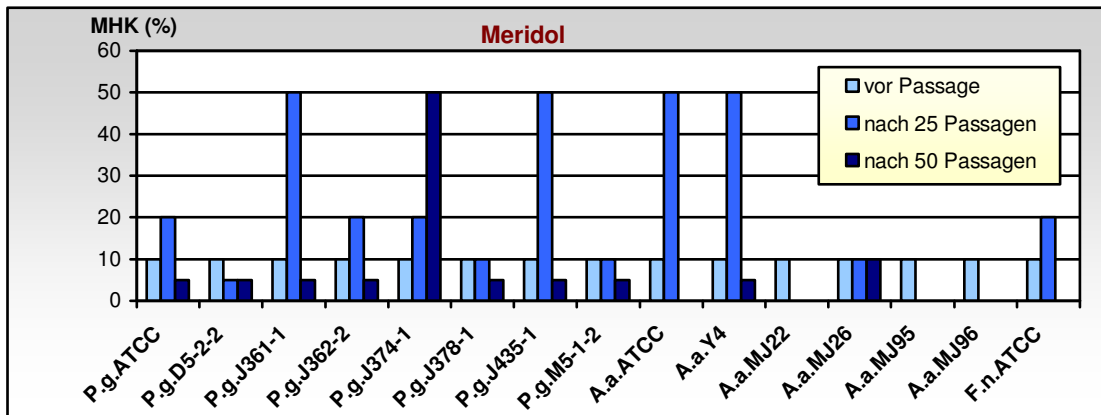


Abb. 12: MHK-Werte der anaeroben/mikroaerophilen Bakterien bei langfristiger Einwirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Meridol (0,5%)

Die aeroben Mikroorganismen reagierten empfindlicher auf die gewählte 1%ige Plattenkonzentration. Nur bei vier Stämmen konnte eine Resistenzentwicklung gegenüber Meridol festgestellt werden. Nach der Hälfte der Passagen erhöhte sich die MHK von *S. salivarius* ATCC 7073 um das Fünffache. *C. albicans* konnte den Anfangswert verdoppeln und *K. oxytoca* erreichte eine Steigerung um das 2,5fache. Bei *E. cloacae* entwickelte sich die Resistenz erst am Ende der 50 Passagen, wobei das Stäbchenbakterium dann Konzentrationen von mehr als 50% Meridol tolerierte (Abb. 13, Tabelle 27 im Anhang).

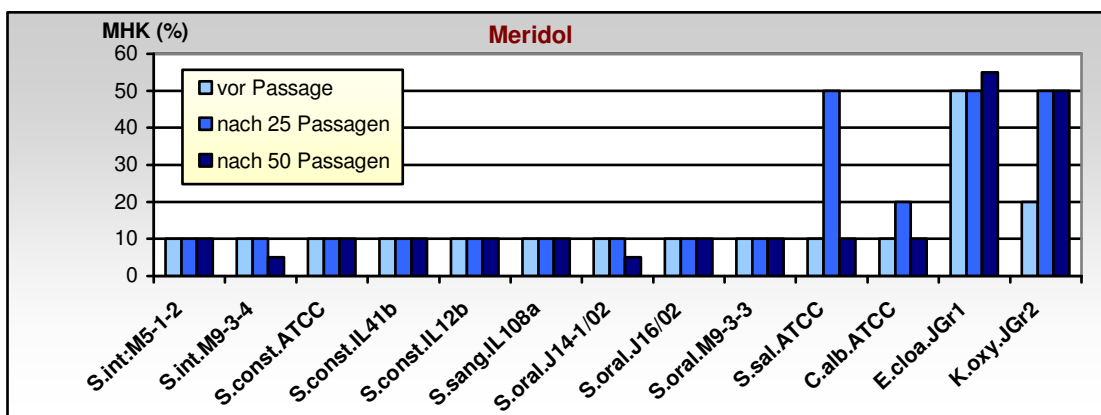


Abb. 13: MHK-Werte der aeroben Mikroorganismen bei langfristiger Einwirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Meridol (1%)

5.2.3 Listerine

Eine Resistenzentwicklung gegenüber Listerine konnte bei den anaeroben/mikroaerophilen Bakterien teilweise nach der Hälfte, bei einem Teil aber auch erst am Ende der 50 Passagen festgestellt werden. Die *P. gingivalis*-Stämme D5-2-2, M5-1-2 und J361-1 hatten ihre MHK-

Werte bereits nach 25 Passagen verdoppelt, letzterer am Ende des Versuches sogar verfünffacht. Bei *F. nucleatum* ATCC 25586 erhöhte sich die minimale Hemmkonzentration ebenso um das Fünffache des Ausgangswertes. Mehr als 50% an Lösung tolerierte nach Abschluss der Versuchsreihe auch *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384, was gleichfalls eine deutliche MHK-Steigerung darstellt. Eine Verdopplung der Werte konnte nach 50 Passagen weiterhin bei *P. gingivalis* J362-2 und *P. gingivalis* J374-1 beobachtet werden (Abb. 14, Tabelle 26 im Anhang).

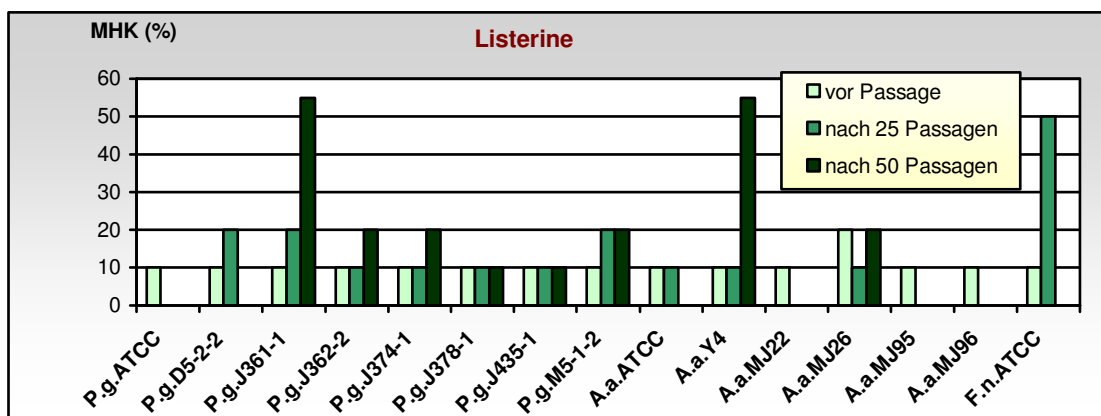


Abb. 14: MHK-Werte der anaeroben/mikroaerophilen Bakterien bei langfristiger Einwirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Listerine (0,5%)

Auch bei den Aerobiern gelang der Nachweis einer Resistenzentwicklung bei acht von dreizehn untersuchten Stämmen. Der Zeitpunkt des Auftretens war hier analog den anaeroben/mikroaerophilen Bakterien unterschiedlich. Eine temporäre Resistenz, die bereits nach 25 Passagen auftrat, konnte bei *S. constellatus* ATCC 27823 (2,5fache Steigerung), *S. constellatus* IL41b (fünffache Steigerung) und *S. salivarius* ATCC 7073 (2,5fache Steigerung) beobachtet werden. Bei *C. albicans* ATCC 76615 erhöhte sich die MHK ebenfalls um das Fünffache, am Ende der Passagen wuchs dieser Stamm sogar auf Agarplatten, denen mehr als 50% an Antiseptikum zugesetzt wurde. Eine 2,5fache Zunahme der Ausgangs-MHK konnte zum Versuchsabschluss auch bei *K. oxytoca* JGr2 und *S. oralis* J16/02 festgestellt werden. Jeweils mehr als 50% Listerine tolerierten nach 50 Passagen gleichfalls die Stämme *S. oralis* J14-1/02 und *S. sanguinis* IL108a (Abb. 15, Tabelle 27 im Anhang).

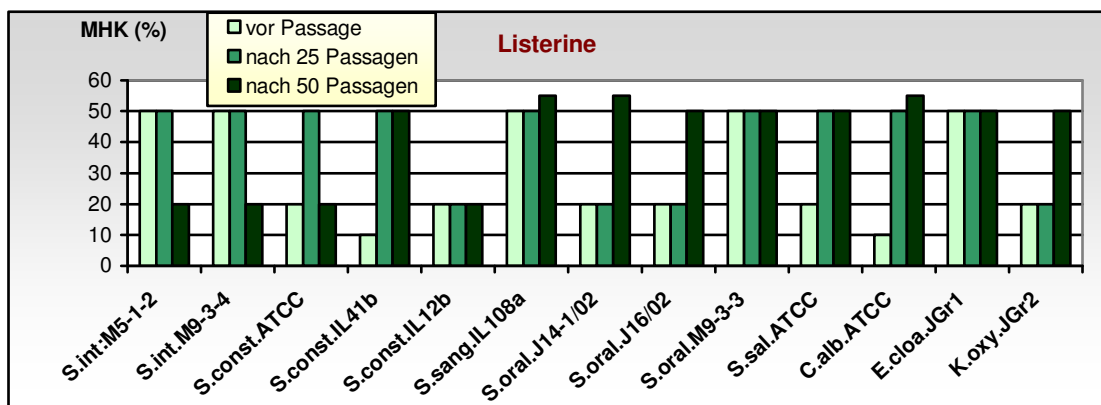


Abb. 15: MHK-Werte der aeroben Mikroorganismen bei langfristiger Einwirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Listerine (1%)

5.3 Versuch des Nachweises eines Efflux-Mechanismus

Mit diesem Versuchsansatz sollte festgestellt werden, ob für die beobachtete temporäre Resistenz so genannte Efflux-Pumpen verantwortlich sind. Dies wäre der Fall gewesen, wenn die Mikroorganismen, die zusätzlich zur Testsubstanz mit Reserpin inkubiert worden sind, nach Versuchsabschluss eine deutlich niedrigere Zahl an KBE aufgewiesen hätten, als diejenigen, denen nur das Antiseptikum zugegeben wurde. Bei den Lösungen Chlorhexidin und Listerine konnte jedoch bei keinem der untersuchten Stämme das erwartete Ergebnis beobachtet werden. Des Weiteren waren für die dritte Testsubstanz Meridol, mit Ausnahme des Stammes *K. oxytoca* JGr 2, aufgrund fehlenden Wachstums der übrigen Stämme keine aussagekräftigen Werte zu ermitteln. Auch *F. nucleatum* ATCC 25586 ist in der Versuchsreihe mit Listerine nicht mehr gewachsen und daher nicht in die Bewertung einbezogen worden. Somit konnte der vermutete Efflux-Mechanismus nicht nachgewiesen werden. (Abb. 16, Abb. 17, Abb. 18, Tabellen 28, 29 und 30 im Anhang).

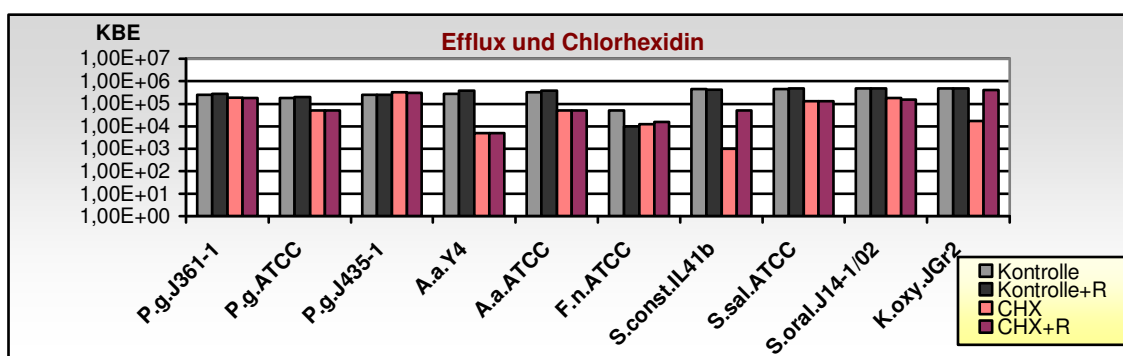


Abb. 16: Zahl der KBE nach Inkubation der Bakterien mit 0,001% CHX und Reserpin

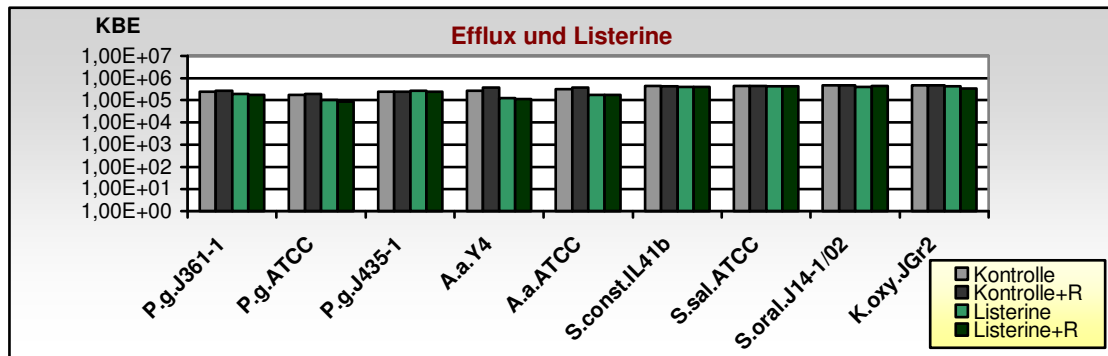


Abb. 17: Zahl der KBE nach Inkubation der Bakterien mit 10% Listerine und Reserpin

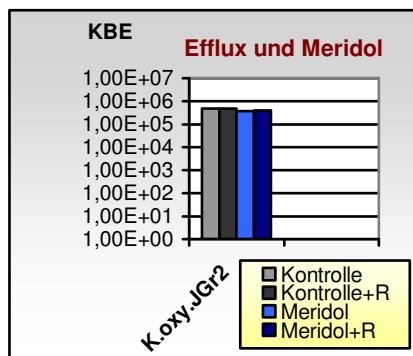


Abb. 18: Zahl der KBE nach Inkubation der Bakterien mit 5% Meridol und Reserpin

5.4 Auswertung der REM-Aufnahmen

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen von *S. constellatus* IL12b, *F. nucleatum* ATCC 25586 und *P. gingivalis* M5-1-2 sollte abschließend die Wirkung des Chlorhexidins an den Bakterienmembranen veranschaulicht werden. Bei den Aufnahmen der Bakterien, die mit Chlorhexidin inkubiert wurden, sieht man in der Zirkumferenz deutlich Zellbestandteile, die durch die zerstörten Membrananteile aus den Mikroorganismen ausgetreten sind (Abb. 19).

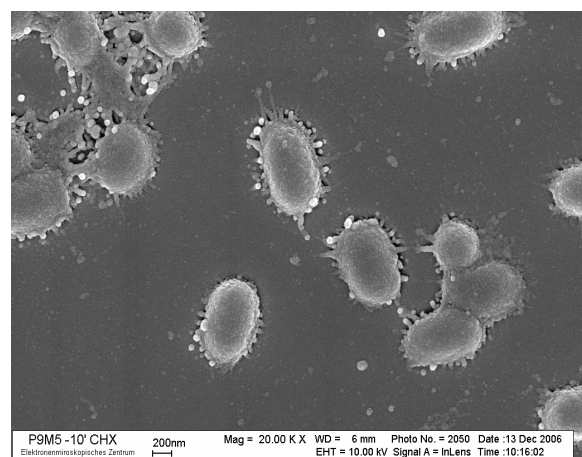
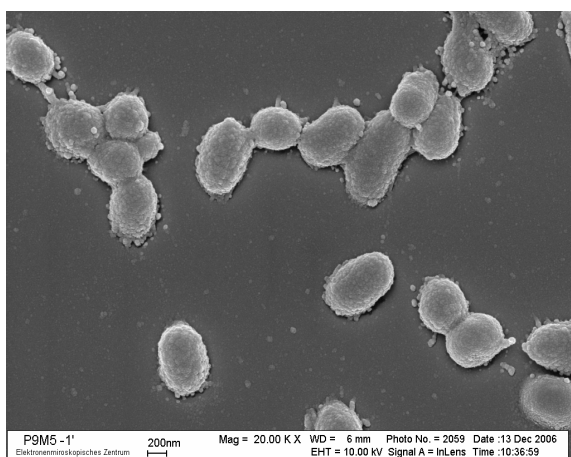
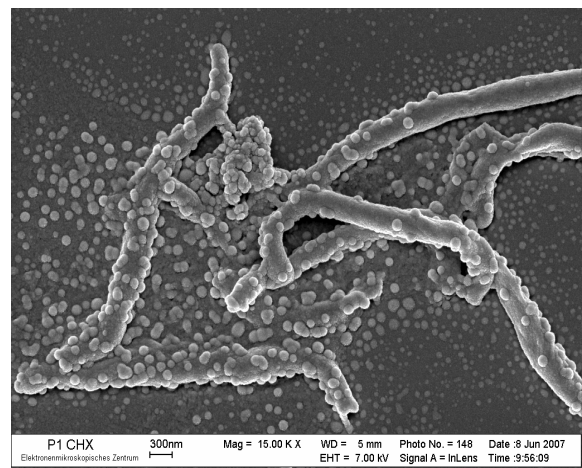
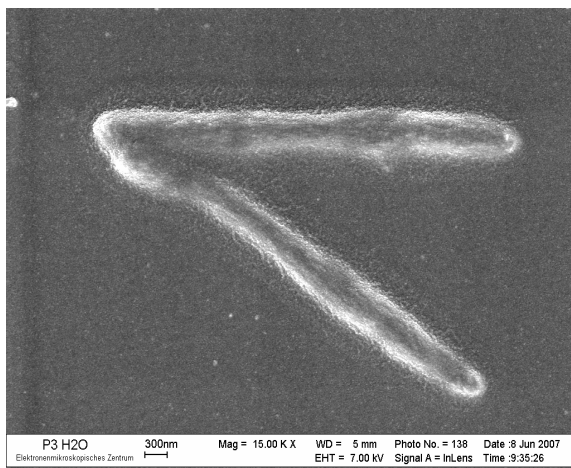
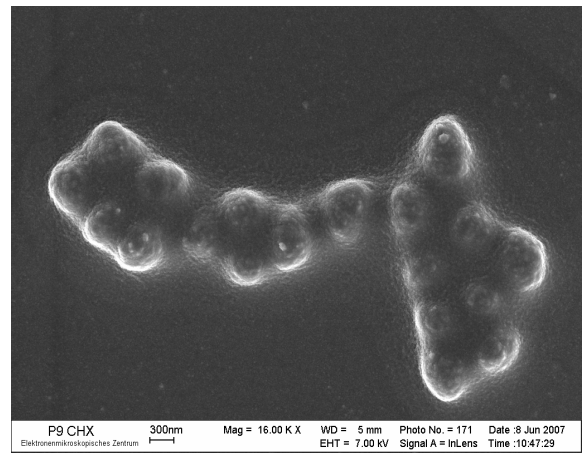
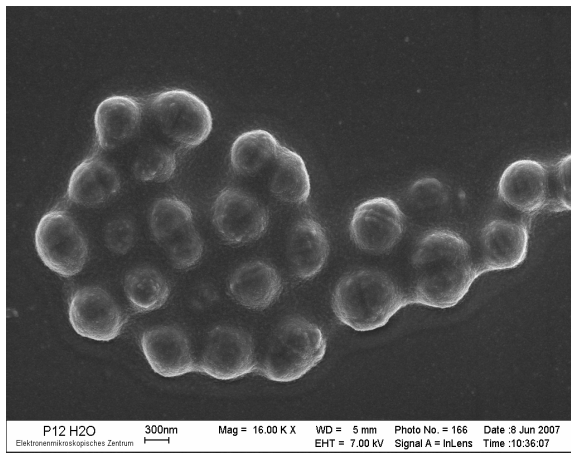


Abb. 19: Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop (oben: *S. constellatus* IL12b; Mitte: *F. nucleatum* ATCC 25586; unten: *P. gingivalis* M5-1-2; linke Seite: ohne Einwirkung von CHX; rechte Seite: nach Inkubation mit 1%igem Chlorhexidin)

6. Diskussion

Chlorhexidindiglukonat wird seit vielen Jahren erfolgreich in der Zahnmedizin zur chemotherapeutischen Behandlung von parodontalen Erkrankungen eingesetzt und stellt so eine wertvolle Ergänzung zu manuellen Therapiemaßnahmen dar (De Soete 2002). Dabei steht heute eine Vielzahl von Präparaten zur Verfügung, die mit der hervorragenden antimikrobiellen Wirksamkeit des Wirkstoffes Chlorhexidin werben. Im Rahmen dieser Studie sollte eine Auswahl dieser Produkte hinsichtlich ihrer Wirkung auf parodontopathogene Bakterien der Mundhöhle untersucht und mit zwei chlorhexidinfreien Lösungen verglichen werden.

In der Literatur sind zahlreiche Studien zu finden, die sich mit der Problematik der Resistenzentwicklung oralpathogener Keime bei unsachgemäßer Anwendung von Antibiotika beschäftigen (Slots and Pallasch 1996, Weinberg and Bral 1998, Glick 2005). Verschiedene Autoren beobachteten in diesem Zusammenhang auch eine verminderte Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber anderen antimikrobiellen Agenzien, wie Chlorhexidin und Triclosan (Russell 2000, Fraise 2002, Poole 2002). Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bestand somit darin zu untersuchen, ob eine langfristige Einwirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Mundspüllösungen eine mögliche Resistenzentwicklung bei ausgewählten Bakterienstämmen fördert.

6.1 Methodik

Obwohl neben *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* noch andere Keime, wie *T. forsythia*, *P. intermedia* und *T. denticola* eng mit dem Auftreten einer Parodontitis assoziiert sind (DGZMK 2005, van Winkelhoff et al. 2002), sollten sich die Untersuchungen auf die beiden Leitkeime parodontaler Erkrankungen sowie auf *F. nucleatum*, der als „Brückenkeim“ im Biofilm fungiert, beschränken. Für die Versuche wurden bei der Spezies *A. actinomycetemcomitans* der Typ-Stamm ATCC 33384, der als Serotyp c häufiger bei klinisch gesunden Probanden isoliert werden kann und der Y4-Stamm, welcher zum Serotyp b gehört und eine deutlich höhere Virulenz aufweist (Yang et al. 2005, Kolodrubetz et al. 1996), ausgewählt.

Des Weiteren erfolgte eine Gegenüberstellung des Referenzstammes *P. gingivalis* ATCC 33277 mit neun klinischen Isolaten von Patienten mit Parodontitis.

Chlorhexidin besitzt eine unspezifische antimikrobielle Aktivität und ist daher gleichermaßen gegenüber gramnegativen und grampositiven sowie anaeroben und aeroben Keimen wirksam (Emilson 1977). Aus diesem Grund sind in diese Studie neben den Hauptvertretern von Parodontalerkrankungen weitere Spezies, die zur Standort- oder Durchgangsflora der Mundhöhle gehören, einbezogen worden. Neben zehn verschiedenen Streptokokkenarten wurden auch zwei gramnegative Stäbchen und ein Referenzstamm von *Candida albicans* untersucht. Auf diese Weise konnte die Wirkung des Biguanids auf verschiedene orale Mikroorganismen, die in planktonischer Form vorlagen, verglichen und dabei ein differenziertes Verhalten der Spezies beobachtet werden.

Der Erfolg der adjuvanten Anwendung antiseptischer Lösungen bei der Parodontitistherapie, insbesondere mit Chlorhexidin als Inhaltsstoff, ist unumstritten und wurde schon von vielen Autoren publiziert (Brex et al. 1992, Auschill et al. 2005). Aus der Vielzahl der heute auf dem Markt befindlichen Produkte wurden für unsere Studie sieben häufig verwendete kommerzielle Chlorhexidinpräparate ausgewählt und in ihrer Wirkung mit vier individuell hergestellten Lösungen verglichen. Die Verdünnung von 20%igem Chlorhexidindigluconat mit destilliertem Wasser erfolgte dabei auf klinisch gebräuchliche Konzentrationen von 0,06%, 0,12%, 0,2% und 1%, die sich auch in den Fertigprodukten widerspiegeln. Aufgrund der lokalen Nebenwirkungen des Biguanids sucht man nach Alternativen bei den Antiseptika. Riep et al. (1999) verglichen in ihrer Studie die beiden ebenfalls häufig angewendeten Spüllösungen Meridol und Listerine in ihrer Wirksamkeit. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Überlegenheit von Listerine gegenüber Meridol. Auch die Untersuchungen von Pan et al. (1999) bestätigen die gute antibakterielle Wirkung von Listerine, sodass wir beide Lösungen zum Vergleich in unsere Studie einbezogen haben. Als Negativ-Kontrolle wurde bei allen Versuchen Aqua dest. verwendet.

Um mundähnliche Bedingungen zu erhalten, wurden die Mikroorganismen für 1 min den Agenzien ausgesetzt, was der empfohlenen Spüldauer eines oralen Antiseptikums entspricht. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5%. Diese Art der Versuchsdurchführung erlaubte es, Rückschlüsse auf ein analoges Verhalten der Bakterien im oralen Milieu zu ziehen.

Dass Bakterien die Fähigkeit besitzen, gegenüber Antibiotika eine Resistenz zu entwickeln, ist bereits von Dr. Alexander Fleming im Jahr 1929 vermutet und seitdem vielfach erforscht und beschrieben worden (Fleming 1929). Die Anwendung sollte daher stets mit Bedacht und möglichst erst nach Erstellung eines Antibiotogramms erfolgen (Slots and Pallasch 1996). Ebenso können Mikroorganismen bei langfristiger Therapie mit desinfizierenden Lösungen mit einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber dem Agens reagieren. Im zweiten Teil unserer Studie sollte deshalb untersucht werden, ob eine langfristige Anwendung von subinhibitorischen Konzentrationen der am häufigsten verwendeten Mundspüllösungen Chlorhexidin, Meridol und Listerine eine Resistenzentstehung der Mikroorganismen fördert. Die minimale Hemmkonzentration der Bakterien wurde mittels Agardilution, welche ein gängiges Verfahren in der Mikrobiologie darstellt, ermittelt. Um alle Keime bei diesem Versuchsaufbau zu berücksichtigen, wählten wir als Plattenkonzentration ca. $\frac{1}{4}$ der geringsten MHK. Die 50 Passagen, die im Abstand von 2-3 Tagen stattfanden, sollten eine Langzeitanwendung der Antiseptika simulieren, wobei die Inkubation der Mikroorganismen auch hier unter mundmilieuähnlichen Bedingungen erfolgte.

Bei einigen der untersuchten Bakterienstämme konnten wir im Verlauf der Passagen eine, zumeist temporäre, Resistenzentwicklung beobachten. Wissenschaftlich sind verschiedene Möglichkeiten erforscht worden, mit denen Mikroorganismen gegen sie gerichtete Substanzen eliminieren können. Am häufigsten wird in der Literatur jedoch von aktiven Efflux-Pumpen berichtet, die als membranständige Proteine das schädigende Agens umgehend wieder aus der Bakterienzelle heraus transportieren (Poole 2005, Fraise 2002). Die Funktion dieser Pumpen kann durch verschiedene Hemmstoffe, wie Piperine (Kumar et al. 2008), 5'-Methoxyhydrnocarpin-D (Lewis 2001) und das pflanzliche Alkaloid Reserpin (Ahmed et al. 1993) ausgeschaltet werden. Sowohl De Marco et al. (2007) als auch Garvey und Piddock (2008) konnten in ihren Studien mit Reserpin ein aktives Efflux-System bei *Staphylococcus aureus* bzw. *Streptococcus pneumoniae* nachweisen. Beide beobachteten in ihren Versuchen eine deutliche Verringerung der minimalen Hemmkonzentration von Antibiotika oder Antiseptika bei Reserpin-Zugabe. Auch wir verwendeten das Alkaloid in einer Konzentration von 10 mg/l, das den Testsubstanzen beigelegt wurde. Allerdings sollte dessen Wirkung direkt über das Wachstumsverhalten der ausgewählten Stämme und nicht über die MHK beurteilt werden.

6.2 Vergleich der antimikrobiellen Aktivität

Eines der Hauptanliegen dieser Studie bestand darin, die Wirksamkeit verschiedener auf dem Markt angebotener Chlorhexidinpräparate sowohl untereinander als auch mit der von individuell aus 20%igem Chlorhexidindiglukonat und destilliertem Wasser hergestellten Lösungen zu vergleichen. Dabei konnten wir feststellen, dass sich die 13 untersuchten Präparate hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivität stark voneinander unterschieden und bei den untersuchten Spezies differenzierte Reaktionen hervorriefen. Auch innerhalb einer Bakterienart waren Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber den Agenzien erkennbar. Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen aus unseren Untersuchungen formulieren:

Die Chlorhexidinzubereitungen waren insgesamt den Handelspräparaten überlegen. Mit der 1%igen Lösung konnten alle ausgewählten Mikroorganismen vollständig eliminiert werden. Die niedriger konzentrierten Antiseptika bewirkten bei den Parodontitisleitkeimen *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* keine oder nur geringe Keimreduktionen. Bei allen anderen Spezies zeigte sich ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Wirksamkeit der Testsubstanzen. Am empfindlichsten reagierte *F. nucleatum* ATCC 25586, wo mit allen individuell hergestellten Chlorhexidinlösungen bereits nach 1 h eine vollständige Elimination erreicht werden konnte.

Bei den handelsüblichen chlorhexidinhaltigen Antiseptika zeichneten sich deutliche Unterschiede bezüglich der antimikrobiellen Aktivität ab. Die Chlorhexamed-Produkte zeigten die besten Ergebnisse, wobei auch hier das 1%ige Gel in seiner Wirkung herausragte. Dieses sorgte mit Ausnahme der Spezies *P. gingivalis* bei allen anderen Mikroorganismen für eine erhebliche Reduktion der Keimzahl bis hin zur vollständigen Elimination. Auffällig war, dass innerhalb dieser drei Präparate kein Zusammenhang zwischen Konzentration und Wirkungspotential erkennbar war. Die 0,06%ige Chlorhexamed-Lösung mit Fluorid wirkte speziesspezifisch sogar besser als das 1%ige Gel. Dieser Sachverhalt spiegelt sich in der kompletten Keimabtötung aller untersuchten *P. gingivalis*-Stämme wieder.

Das 0,12%ige Oral B sowie das Fertigprodukt Meridol+CHX 0,2% konnten bei den aeroben Spezies die Keimzahlen um mehrere log-Stufen senken, bei den gramnegativen Mikroorganismen war die antibakterielle Wirkung dagegen sehr gering.

Die insgesamt schlechtesten Werte erzielten bei allen untersuchten Keimen die beiden Curasept-Präparate. Außer bei *C. albicans* zeigten beide Lösungen keine antimikrobielle Aktivität, wobei auch beim höher konzentrierten Agens keine verbesserten Eigenschaften zu beobachten waren.

Die scheinbare Überlegenheit der individuell hergestellten Chlorhexidinlösungen könnte auf dem Fehlen von bestimmten Zusatzstoffen beruhen, welche die Wirkungsweise des Biguanids negativ beeinflussen oder gar ganz aufheben. Über den Zusatz von Fluoriden zu Chlorhexidinprodukten findet man in der Literatur verschiedene Angaben. Schon Dolles et al. untersuchten 1979 die Kombination von Chlorhexidin und Natriumfluorid in Zahnpasten und konnten keine gegenseitige Wirkungseinschränkung feststellen. Auch Lorenz et al. (2006) beobachteten in ihrer Studie keine Beeinträchtigung des Wirkstoffes durch Sodium-Fluoride. Dagegen lieferte die Kombination Chlorhexidin-Natriumfluorid in den Untersuchungen von Roldán et al. 2004 von allen untersuchten CHX-Präparaten die schlechtesten Ergebnisse. Die von uns getestete Chlorhexamed-Lösung 0,06%+Fluorid zeigte unter den kommerziellen Produkten jedoch ebenfalls eine sehr gute antibakterielle Wirkung, sodass für eine Aktivitätsminderung des Biguanids wahrscheinlich andere Zusätze, z.B. bestimmte (anionische) Detergenzien, verantwortlich sind.

Dem Zusatz von Alkohol in Mundspülpräparaten wird in verschiedenen Studien eine Verbesserung des antimikrobiellen Effekts zugeschrieben (Herrera et al. 2003). Obwohl in unseren Untersuchungen die beiden Curasept-Produkte als alkoholfreie Lösungen die schlechtesten antiseptischen Eigenschaften demonstrierten, konnten wir bei den anderen Testsubstanzen keinen Zusammenhang zwischen Wirkung und Alkoholanteil feststellen. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Leyes Borrajo et al. (2002) und der Arbeitsgruppe um van Strydonck (2005) überein.

Bei den zwei chlorhexidinfreien Mundspüllösungen Meridol und Listerine zeigte letztere insgesamt eine deutlich stärkere desinfizierende Wirkung, vor allem gegenüber den anaeroben und mikroaerophilen Keimen. Die Kombination ätherischer Öle erreichte bei allen untersuchten Spezies eine deutliche Keimzahlreduktion, oft sogar bis zur völligen Elimination. Auch bei *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* konnte die Zahl der KBE um mehrere log-Stufen gesenkt werden. Beeindruckend war hierbei, dass das antimikrobielle Potential dieser Lösung in unseren Versuchen sogar annähernd an das der individuell

hergestellten Chlorhexidinlösungen heranreichte. Auch in der In-vivo-Studie von Shah et al. (1993) wird von einer etwa gleichstarken Wirksamkeit von Listerine und Chlorhexidin berichtet, allerdings findet man in der Literatur bedeutend mehr Arbeiten, die die Überlegenheit des Biguanids gegenüber allen anderen Antiseptika darstellen (Overholser et al. 1990, Brex et al. 1992).

Zusammenfassend kann man aus den Ergebnissen dieses Versuchsteiles schlussfolgern, dass die Wirksamkeit verschiedener chlorhexidinhaltiger Präparate nicht in erster Linie von deren Konzentration abhängig ist. Vielmehr entscheidend ist dafür die Gesamtformulierung bzw. Galenik eines Produktes. Der Zusatz bestimmter Detergenzien kann die Wirkung des Chlorhexidins einschränken oder es sogar vollständig inaktivieren. Aus diesem Grund waren die individuell hergestellten Lösungen in unserer Studie den meisten Fertigprodukten überlegen. Des Weiteren lässt sich den Beobachtungen zufolge die Aussage von Puig Silla et al. (2008) bestätigen, dass Chlorhexidin in geringerer Konzentration besser auf grampositive Spezies wirkt und erst in hoher Konzentration (1%) zu einer Keimeliminierung bei den gramnegativen Stämmen führt. Dieser Umstand ist für die klinische Anwendung nicht unbedeutend, da für die Effektivität eines Antiseptikums immer die endgültige Konzentration am Wirkort entscheidend ist.

Bei der Bewertung dieser Ergebnisse sollte jedoch auch beachtet werden, dass diese in einer In-vitro-Studie ermittelt und die Untersuchungen jeweils an planktonisch vorliegenden Keimen eines Stammes durchgeführt wurden. Um die Wirkung der Mundspüllösungen im oralen Milieu beurteilen zu können, wären klinische Studien oder weitere Versuche an etablierten Biofilmen nötig, da es erwiesen ist, dass bakterielle Gemeinschaften eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Substanzen aufweisen (Fine et al. 2001, Thrower et al. 1997, Donlan and Costerton 2002). Andererseits kann aber davon ausgegangen werden, dass diejenigen Agenzien, die in unseren In-vitro-Untersuchungen keine antibakterielle Aktivität zeigten auch in vivo keine keimreduzierenden Eigenschaften aufweisen werden.

6.3 Temporäre Resistenzentwicklung

Während die Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika ein seit vielen Jahren bekanntes und vielfach diskutiertes medizinisches Problem darstellt, wurde dieses Phänomen bei desinfizierenden Lösungen lange Zeit unterschätzt. Auch bei Chlorhexidin hielt man die Adaptation der Zielorganismen aufgrund des breiten, unspezifischen Wirkungsspektrums des Biguanids eher für unwahrscheinlich (Westergren and Emilson 1980). Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass verschiedene Bakterien bei Langzeitanwendung von Antiseptika, insbesondere Triclosan oder quaternären Ammoniumverbindungen, mit einer verringerten Empfindlichkeit reagieren (Fraise 2002). Ebenso berichtet Poole in seiner Studie von 2005 über mögliche Kreuz-Resistenzen zwischen Antibiotika und Desinfektionsmitteln und bezieht sich dabei auch auf Chlorhexidin.

Grundsätzlich gibt es verschiedene mögliche Ursachen dafür, weshalb bestimmte Bakterienspezies primär durch antimikrobielle Substanzen reduziert bzw. eliminiert werden können, bei langfristiger Therapie jedoch nur noch schlecht oder gar nicht mehr auf die entsprechende Lösung ansprechen. Liegt keine generelle Unempfindlichkeit gegenüber dem Agens vor, spielen zumeist resistente Mikroorganismen eine Rolle. Die Resistenz kann dabei durch Mutationen hervorgerufen oder durch Transfer von genetischem Material zwischen derselben oder unterschiedlichen Spezies erworben werden (Gilbert et al. 1997).

Zur Ausbildung einer Resistenz kommt es insbesondere dann, wenn subinhibitorische Konzentrationen eines Antiseptikums über einen andauernden Zeitraum auf die Bakterien einwirken. Nach Marsh (1992) ist dies die Dosis, die nach Abklingen des initialen Effektes der Mundspüllösung durch Adsorption an die Oberflächen der oralen Hart- und Weichgewebe im Mundmilieu vorliegt. Auch sublethale Konzentrationen können noch einen therapeutischen Effekt erzielen, indem sie den Metabolismus der Mikroorganismen, wie die Protease-Aktivität, hemmen und so deren Wachstum verlangsamen. Ein gutes antimikrobielles Präparat sollte daher auf diese Weise auch bei Langzeit-Anwendung wirken und weder die natürliche Bakterienflora stören, noch zur Ausbildung bakterieller Resistenzen führen (Marsh 1992).

Wie bereits erwähnt, findet man jedoch verschiedene Angaben in der Literatur, die von einer verringerten bakteriellen Empfindlichkeit bei Langzeitanwendung von Antiseptika, u.a. auch

von Chlorhexidin, berichten. Allerdings gibt es bisher keine vergleichbaren Untersuchungen zur Resistenzentwicklung gegenüber Meridol und Listerine. Aus diesem Grund wollten wir im zweiten Teil unserer Studie der Frage nachgehen, wie ausgewählte Bakterienspezies auf die langfristige Einwirkung subinhibitorischer Konzentrationen dieser drei Lösungen reagieren. Dreizehn aerobe, neun anaerobe und sechs mikroaerophile Stämme oraler Mikroorganismen wurden dafür über 50 Passagen Konzentrationen unterhalb der kumulativen MHK ausgesetzt. Anhand der erneuten Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration nach der Hälfte bzw. am Ende der Passagen konnte die Änderung der bakteriellen Toleranzgrenze ermittelt werden. Einen ähnlichen Versuchsaufbau verwendeten auch Tambe et al. in ihrer Studie von 2001.

Bei mehreren Bakterienstämmen beobachteten wir im Verlauf der Untersuchungen eine Verringerung der Sensibilität gegenüber einer oder mehrerer Testlösungen. Die Erhöhung der MHK-Werte lag dabei zwischen dem Zweifachen und in Einzelfällen mehr als dem Zehnfachen des Ausgangswertes. Eine Tendenz, dass bestimmte Spezies einheitlich oder zumindest ähnlich auf ein Präparat reagieren, konnte dabei nicht festgestellt werden. Auffällig war jedoch, dass es sich bis auf wenige Ausnahmen um eine passagere Resistenzentwicklung handelte. Diese Tatsache lässt vermuten, dass der Mechanismus, welcher für die Entstehung der Resistenz verantwortlich ist, nicht von dauerhafter Natur ist, sondern sich mit fortschreitender Einwirkung der Mundspüllösungen erschöpft. Auch wurde in dieser Versuchsreihe deutlich, dass nicht alle Bakterienstämme eine langfristige Anwendung oraler Antiseptika tolerieren und somit wahrscheinlich nicht über entsprechende Abwehrstrategien verfügen.

Eine weitere wichtige Erkenntnis, die wir unseren Untersuchungen entnehmen konnten, ist die Tatsache, dass die aeroben Spezies bereits vor Beginn der Passagen bedeutend höhere Konzentrationen an Chlorhexidin und Listerine tolerierten als die Anaerobier bzw. Mikroaerophilen. Auch nach 25 Passagen waren die MHK-Werte der aeroben Stämme, die eine Resistenz zeigten, gegenüber letzteren erhöht. Bei Chlorhexidin adaptierte sich ein Teil der Aerobier an Konzentrationen von 1% und mehr. Im Vergleich dazu konnten die gramnegativen Mikroorganismen nur auf Agarplatten mit maximal 0,2% CHX kultiviert werden. Dies würde jedoch bedeuten, dass grampositive, aerob wachsende Mikroorganismen schon primär und auch bei Langzeiteinwirkung dieser Lösung weitaus weniger sensibel reagieren als gramnegative Anaerobier bzw. mikroaerophile Bakterien und somit resistenter

sind. Diese Beobachtung steht nicht nur im Widerspruch zu den Ergebnissen aus dem ersten Teil unserer Studie, sondern auch zu anderen wissenschaftlichen Aussagen, wie der von Puig Silla et al. (2008), die eine bessere antibakterielle Wirksamkeit von Chlorhexidin gegenüber grampositiven Erregern favorisieren. Allerdings führten McBain et al. 2004 eine ähnliche In-vitro-Studie durch, mit welcher sie die Auswirkungen des Langzeitgebrauchs von Triclosan auf verschiedene orale Bakterien untersuchten. Auch sie stellten eine geringere Empfindlichkeit grampositiver Streptokokken fest, während die gramnegativen Anaerobier hoch sensibel reagierten. Eine Erklärung für diese Beobachtung konnten wir innerhalb dieser Studie nicht finden, es ist jedoch zu vermuten, dass es sich bei den betreffenden aeroben Stämmen um primär resistente Bakterien handelte.

Mit diesem Teil unserer Studie konnte nachgewiesen werden, dass sowohl grampositive als auch gramnegative Erreger der Mundhöhle fähig sind, zumindest temporär eine Resistenz gegenüber der dauerhaften Einwirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Chlorhexidin, Meridol und Listerine zu entwickeln und somit über entsprechende Abwehrmechanismen verfügen müssen.

6.4 Versuch eines Efflux-Nachweises

Die gebräuchlichsten Mechanismen der Antibiotika-Resistenz, wie sie in gramnegativen und in allen anderen Bakterienarten vorkommen können, lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Reduktion der Aufnahme des Agens in die Bakterienzelle; Veränderung der mikrobiellen Zielstrukturen mit dem Resultat einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber der Substanz; Produktion von bakteriellen Enzymen, die in der Lage sind, das Chemotherapeutikum abzubauen bzw. zu inaktivieren und/oder das aktive Ausschleusen eines Antibiotikums über Efflux-Pumpen (Siu 2002).

Im Zusammenhang mit der so genannten Multi-drug-Resistance wird häufig von speziellen Membranproteinen berichtet, die einen aktiven Efflux eines schädigenden Agens aus der Bakterienzelle bewirken. Die Expression bzw. Aktivierung solcher Pumpen wird über Signale aus der mikrobiellen Umwelt oder aber durch Mutationen in den Regulator-Genen gesteuert (Levy 2002). Die bisher bekannten bakteriellen Efflux-Systeme können in fünf Klassen eingeteilt werden: die major facilitator superfamily (MF), die ATP-binding cassette family

(ABC), die resistance-nodulation-division family (RND), die small multidrug resistance family (SMR) und die multidrug and toxic compound extrusion family (MATE), wobei die RND-Familie bei gramnegativen Bakterien am häufigsten zu finden ist (Poole 2005).

Escherichia coli ist das Bakterium, welches bisher am intensivsten hinsichtlich dieser Pumpen erforscht worden ist (Nikaido and Takatsuka 2008). Ein spezielles Gen, das CepA-Gen, welches zu einem aktiven Efflux von Chlorhexidin führt, konnte hier neben zahlreichen anderen isoliert werden. Auch Qac A und B, zwei Determinanten, die vor allem für das Ausschleusen von quaternären Ammoniumverbindungen in grampositiven Spezies verantwortlich gemacht werden, sollen im Zusammenhang mit einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber dem Bis-biguanid stehen (Poole 2005). Die genauen Mechanismen, die zu einer Resistenz gegenüber Chlorhexidin führen, sind jedoch bisher nicht bekannt. Ebenso wenige Angaben in der Literatur findet man diesbezüglich zu den oralen Antiseptika Meridol und Listerine.

Im dritten Teil unserer Studie beschäftigten wir uns daher mit der Frage, ob die von uns beobachtete passagere Resistenz mehrerer Bakterienstämme auf einem aktiven Efflux der getesteten Substanzen beruht. Wir verwendeten dafür das pflanzliche Alkaloid Reserpin, das ein bekannter Hemmstoff verschiedener Efflux-Systeme ist. In einer Konzentration von 10 mg/l wurde es den Testlösungen Chlorhexidin, Meridol und Listerine zugesetzt. Vier aerobe und sechs anaerobe/mikroaerophile Spezies, die eine Erhöhung der MHK um mehrere Stufen am Ende der 50 Passagen zeigten, wurden damit inkubiert und anschließend kultiviert. Die Vermutung, dass diese im Vergleich zu den Suspensionen, die nur mit den Testsubstanzen konfrontiert wurden, nach Anzüchtung eine deutlich geringere Anzahl an KBE aufweisen würden, konnte unseren Beobachtungen zufolge nicht bestätigt werden. Eine Hemmung des Bakterienwachstums unter Reserpin-Einwirkung hätte die Existenz von Efflux-Pumpen beweisen können, jedoch konnte dieser Nachweis mit unserem Versuchsaufbau nicht erbracht werden.

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass für die beobachtete Resistenzentwicklung bei Langzeiteinwirkung der Mundspüllösungen Chlorhexidin, Meridol und Listerine nicht, wie vermutet, Efflux-Systeme verantwortlich sind, sondern dass andere Abwehrmechanismen als Ursache zu Grunde liegen. Dabei könnte vor allem die äußere Bakterienmembran, die eine wichtige Barrierefunktion für antibakterielle Substanzen darstellt, eine entscheidende Rolle

spielen (Russell et al. 1998). Auch Grenier et al. (1995) entdeckten bestimmte Vesikel in der äußeren Membran von *P. gingivalis*, die fähig sind, Chlorhexidin zu binden und somit die Empfindlichkeit gegenüber dieser Lösung zu verringern. Weitere Studien in dieser Richtung könnten so zur Aufklärung der Resistenzmechanismen gegenüber Antiseptika beitragen.

7. Schlussfolgerungen

Chlorhexidin ist anderen Mundspüllösungen hinsichtlich des antimikrobiellen Potentials überlegen. Individuell hergestellte Lösungen aus 20%igem Chlorhexidindigluconat und destilliertem Wasser weisen im Vergleich zu den meisten Handelspräparaten eine bessere Wirksamkeit auf. Geringere CHX-Konzentrationen (0,12%, 0,2%) wirken vor allem bei grampositiven, aeroben Mikroorganismen bakterizid oder bakteriostatisch während für eine vollständige Elimination der beiden Parodontitisleitkeime *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* höhere Konzentrationen des Wirkstoffes (1%) notwendig sind.

Eine konzentrationsabhängige Wirkung ist bei den Chlorhexidinzubereitungen nachweisbar, jedoch nicht bei den untersuchten kommerziellen CHX-Produkten. Hier ist vielmehr die Gesamtformulierung (Galenik) von Bedeutung. Zusatzstoffe wie Fluoride, Alkohol oder bestimmte Detergenzien können die Wirksamkeit des Biguanids positiv oder negativ beeinflussen.

Bei den Handelspräparaten besitzen die Chlorhexamed-Produkte, insbesondere die 0,06%ige Lösung mit Fluoridzusatz und das 1%ige Gel, sehr gute antimikrobielle Eigenschaften. Curasept hingegen scheint als orales Antiseptikum aufgrund seiner schlechten desinfizierenden Wirkung (unabhängig von der CHX-Konzentration) nicht geeignet zu sein.

Chlorhexidin verursacht bei längerem Gebrauch lokale Nebenwirkungen, daher sollte die Anwendungsdauer auf maximal zwei Wochen beschränkt werden. Alternativ können chlorhexidinfreie Spüllösungen, auch über einen längeren Zeitraum, zur Keimzahlreduktion in der Mundhöhle beitragen. Hier stellt Listerine das Produkt der Wahl dar. Seine antibakterielle Aktivität ist deutlich größer als die von Meridol und keimspezifisch sogar mit der von individuell hergestellten Chlorhexidinzubereitungen vergleichbar.

Eine Langzeiteinwirkung subinhibitorischer Konzentrationen der Mundspüllösungen Chlorhexidin, Meridol und Listerine auf Mikroorganismen der Mundhöhle verursacht bei einem Teil der Erreger eine deutliche, meist temporäre, Minderung der Empfindlichkeit gegenüber dem Agens. Diese Erscheinung tritt völlig keimunspezifisch auf. Efflux-Pumpen scheinen für diesen Resistenzmechanismus jedoch nicht verantwortlich zu sein.

Weitere Studien sollten der Frage nachgehen, ob eine solche Resistenz gegenüber Mundspüllösungen auch in vivo provoziert werden kann. Ebenso sollte der Vergleich der antimikrobiellen Wirksamkeit verschiedener Chlorhexidinpräparate sowie chlorhexidinfreier Antiseptika in klinischen Studien bzw. an etablierten Biofilm-Modellen durchgeführt werden, um so zu beurteilen, ob die sehr gute In-vitro-Wirkung von Chlorhexidin auch am tatsächlichen Wirkort bestätigt werden kann.

8. Literaturverzeichnis

1. Abe N, Kadowaki T, Okamoto K, Nakayama K, Ohishi M and Yamamoto K. 1998. Biochemical and functional properties of lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) as a virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *J Biochem*, 123: 305-312.
2. Ahmed M, Borsch CM, Neyfakh AA and Schuldiner S. 1993. Mutants of the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Bmr with altered sensitivity to the antihypertensive alkaloid Reserpine. *J Biol Chem*, 268: 11086-11089.
3. Altenhofen E, Lutz F and Guggenheim B. 1989. Microbiologic in vitro comparison of plaque- inhibiting mouthwashes. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 99: 13-18.
4. Amano A. 2003. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*, 74: 90-96.
5. Andrian E, Grenier D and Rouabhia M. 2006. *Porphyromonas gingivalis*-epithelial cell interactions in periodontitis. *J Dent Res*, 85: 392-403.
6. Armitage GC. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4: 1-6.
7. Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A and Arweiler NB. 2005. Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol*, 32: 147-152.
8. Bachrach G, Rosen G, Bellalou M, Naor R and Sela MN. 2004. Identification of a *Fusobacterium nucleatum* 65 kDa serine protease. *Oral Microbiol Immunol*, 19: 155-159.
9. Barnett ML. 2003. The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice: control of supragingival plaque and gingivitis. *J Am Dent Assoc*, 134: 699-704.
10. Beighton D and Whiley RA. 1990. Sialidase activity of the "Streptococcus milleri group" and other viridans group streptococci. *J Clin Microbiol*, 28: 1431-1433.
11. Bernstein D, Schiff G, Echler G, Prince A, Feller M and Briner W. 1990. In vitro virucidal effectiveness of a 0,12%-chlorhexidine gluconate mouthrinse. *J Dent Res*, 69: 874-876.
12. Bhargava HN and Leonard PA. 1996. Triclosan: applications and safety. *Am J Infect Control*, 24: 209-218.
13. Birkedal-Hansen H. 1993. Roles of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodont Res*, 28: 500-510.

14. Bolstad AI, Jensen HB and Bakken V. 1996. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev*, 9: 55-71.
15. Brex M, MacDonald LL, Legary K, Cheang M and Forgay MGE. 1993. Long-term effects of Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis, staining, and bacterial vitality. *J Dent Res*, 72: 1194-1197.
16. Brex M, Brownstone E, MacDonald L, Gelskey S and Cheang M. 1992. Efficacy of Listerine, Meridol and chlorhexidine mouthrinses as supplements to regular tooth cleaning measures. *J Clin Periodontol*, 19: 202-207.
17. Brex M, Netuschil L, Reichert B and Schreil G. 1990. Efficacy of Listerine, Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis and plaque bacteria vitality. *J Clin Periodontol*, 17: 292-297.
18. Cabala A, Chomyszyn-Gajewska M and Drozd W. 2006. Periodontitis and systemic disease relationships. *Przegl Lek*, 63: 773-7.
19. Colombo AP, Haffajee AD, Dewhirst FE, Paster BJ, Smith CM, Cugini MA and Socransky SS. 1998. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*, 25: 169-180.
20. Dalhoff A and Schmitz FJ. 2003. In vitro antibacterial activity and pharmacodynamics of new quinolones. Review. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22: 203-221.
21. Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL and Swain G. 1954. 1:6-Di 4-chlorophenyldiguanido-hexane ("Hibitane"). Laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol*, 9:192-196.
22. DeMarco CE, Cushing LA, Frempong-Manso E, Seo SM, Jaravaza TAA and Kaatz GW. 2007. Efflux-related resistance to Norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51: 3235-3239.
23. De Soete M. 2002. Full mouth one stage disinfection of the oropharynx. A new treatment strategy for periodontitis. *Ned Tijdschr Tandheelkd*, 109:434-8.
24. DGZMK: Beikler T., Karch H. und Flemmig TF. 2005. Mikrobiologische Diagnostik in der Parodontitistherapie. Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten (DGZMK). *DZZ*, 60 12.
25. Dolles OK, Bonesvoll P, Gamst ON and Gjermo P. 1979. Determination of fluoride and chlorhexidine from chlorhexidine/fluoride-containing dentifrices. *Scand J Dent Res*, 87: 115-122.
26. Donlan RM and Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15: 167-193.

27. Eick S and Pfister W. 2004. Efficacy of antibiotics against periodontopathogenic bacteria within epithelial cells: an in vitro study. *J Periodontol*, 75: 1327-1334.
28. Eick S, Schmitt A, Sachse S, Schmidt KH and Pfister W. 2004. In vitro antibacterial activity of flouroquinolones against *Porphyromonas gingivalis* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54: 553-556.
29. Emilson CG. 1977. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res*, 85:255-265.
30. Faveri M, Gursky LC, Feres M, Shibli JA, Salvador SL and de Figueiredo LC. 2006. Scaling and root planing and chlorhexidine mouthrinses in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*, 33: 819-828.
31. Feng Z and Weinberg A. 2006. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol 2000*, 40: 50-76.
32. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB and Souza-Filho FJ. 2007. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Braz Dent J*, 18: 294-298.
33. Fine DH, Furgang D and Barnett ML. 2001. Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol*, 28: 697-700.
34. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP and Brissette C. 1999. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000*, 20: 136-167.
35. Fives-Taylor PM, Meyer DH and Mintz KP. 1995. Characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. *Adv Dent Res*, 9: 55-62.
36. Fleming A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br I Exp Pathol*, 10: 226-236.
37. Floetra L, Gjermo P, Roella G and Waerhaug J. 1971. Side effects of chlorhexidine mouth washes. *Scand J Dent Res*, 79: 119-125.
38. Fraise AP. 2002. Susceptibility of antibiotic-resistant cocci to biocides. *J Appl Microbiol*, 92: 158-162.
39. Fraise AP. 2002. Biocide abuse and antimicrobial resistance – a cause for concern? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 11-12.
40. Garvey MI and Piddock LJV. 2008. The efflux pump inhibitor Reserpine selects multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains that overexpress the ABC transporters PatA and PatB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 1677-1685.

41. Gemmell E, Marshall RI and Seymour GJ. 1997. Cytokines and prostaglandines in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000, 14: 112-143.
42. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P and Tani A. 2008. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro*, 22: 308-317.
43. Gilbert P, Das J and Foley I. 1997. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res*, 11: 160-167.
44. Glick M. 2005. Antibiotics. Is the end in sight? *J Am Dent Assoc*, 136: 844-845.
45. Gold SI. 1985. Periodontics-the past. Part (I) early sources. *J Clin Periodontol*, 12: 79-97.
46. Gordon JM and Walker CB. 1993. Current status of systemic antibiotic usage in destructive periodontal disease. *J Periodontol*, 64: 760-771.
47. Gossling J. 1988. Occurrence and pathogenicity of the *Streptococcus milleri* group. *Rev Infect Dis*, 10: 257-285.
48. Grenier D, Bertrand J and Mayrand D. 1995. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles promote bacterial resistance to chlorhexidine. *Oral Microbiol Immunol*, 10: 319-320.
49. Gusman H, Travis J, Helmerhorst EJ, Potempa J, Troxler RF and Oppenheim FG. 2001. Salivary Histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. *Infect and Immun*, 69: 1402-1408.
50. Guthmiller JM, Lally ET and Korostoff J. 2001. Beyond the specific plaque hypothesis: are highly leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* a paradigm for periodontal pathogenesis? *Crit Rev Oral Biol Med*, 12: 116-124.
51. Hellwig E, Klimek J and Attin T. 2003. Therapie der entzündlichen Parodontopathien. In: Hellwig E, Klimek J and Attin T (Hrsg.). *Einführung in die Zahnerhaltung*. München, Jena: Urban und Fischer, 407 und 457-458.
52. Herrera D, Roldán S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M and Sanz M. 2003. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0,12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an in vitro contact test and salivary bacterial counts study. *J Clin Periodontol*, 30: 307-314.
53. Homer KA, Denbow L, Whiley RA and Beighton D. 1993. Chondroitin sulfate depolymerase and hyaluronidase activities of viridans streptococci determined by a sensitive spectrophotometric assay. *J Clin Microbiol*, 31: 1648-1651.
54. Homer KA, Whiley RA and Beighton D. 1990. Proteolytic activity of oral streptococci. *FEMS Microbiol Lett*, 67: 257-260.

55. Horz HP and Conrads G. 2007. Diagnosis and anti-infective therapy of periodontitis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 5: 703-715.
56. Ibáñez N and Casamada N. 2005. Chlorhexidine: the ideal antiseptic. *Rev Enferm*, 28: 31-35.
57. Imamura T, Travis J and Potempa J. 2003. The biphasic virulence activities of gingipains: activation and inactivation of host proteins. *Curr Protein Pept Sci*, 4: 443-450.
58. Inouye T, Ohta H, Kokeguchi S, Fukui K and Kato K. 1990. Colonial variation and fimbriation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiol. Lett*, 69:13-17.
59. Iwase M, Korchak HM, Lally ET, Berthold P and Taichman NS. 1992. Lytic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human neutrophil cytoplasts. *Journal of Leukocyte Biology*, 52: 224-227.
60. Jansson H. 2006. Studies on periodontitis and analyses of individuals at risk for periodontal diseases. *Swed Dent J Suppl*, 180: 5-49.
61. Jenkins S, Addy M and Newcombe RG. 1994. A comparison of cetylpyridinium chloride, triclosan and chlorhexidine mouthrinse formulations for effects on plaque regrowth. *J Clin Periodontol*, 21: 441-444.
62. Kadowaki T, Nakayama K, Yoshimura F, Okamoto K, Abe N and Yamamoto K. 1998. Arg-gingipain acts as a major processing enzyme for various cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 273: 29072-29076.
63. Kadowaki T, Yoneda M, Okamoto K, Maeda K and Yamamoto K. 1994. Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 269: 21371-21378.
64. Kanno F, Korostoff J, Volgina A and DiRienzo JM. 2005. Resistance of human periodontal ligament fibroblasts to the cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol*, 76: 1189-1201.
65. Killoy WJ. 1999. Assessing the effectiveness of locally delivered chlorhexidine in the treatment of periodontitis. *J Am Dent Assoc*, 130: 567-570.
66. Klinger R. 1912. Untersuchungen über menschliche Aktinomykose. *Centralblatt Bacteriol*, 62: 191-200.
67. Kolahi J and Soolari A. 2006. Rinsing with chlorhexidine gluconate solution after brushing and flossing teeth: a systematic review of effectiveness. *Quintessence Int*, 37: 605-612.
68. Kolenbrander PE, Parrish KD, Andersen RN and Greenberg EP. 1995. Intergeneric coaggregation of oral *Treponema* spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp.. *Infect and Immun*, 63: 4584-4588.

69. Kõljalg S, Naaber P and Mikelsaar M. 2002. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. *J Hosp Infect*, 51: 106-113.
70. Kolodrubetz D, Spitznagel J (JR.), Wang B, Phillips LH, Jacobs C and Kraig E. 1996. Cis elements and trans factors are both important in strain-specific regulation of the Leukotoxin gene in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect and Immun*, 64: 3451-3460.
71. Kornman KS, Page RC and Tonetti MS. 1997. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* 2000, 14: 33-53.
72. Kumar A, Khan IA, Koul S, Koul JL, Taneja SC, Ali I, Ali F, Sharma S, Mirza ZM, Kumar M, Sangwan PL, Gupta P, Thota N and Qazi GN. 2008. Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, 61: 1270-1276.
73. Kurbad A, Gängler P and Kaufmann K. 1990. Evaluation of the efficacy of sanguinarine using the experimental gingivitis model. *Stomatol DDR*, 40: 157-159.
74. Levy SB. 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol*, 92: 65-71.
75. Levy SB. 2000. Antibiotic and antiseptic resistance: impact on public health. *Pediatr Infect Dis J*, 19: 120-122.
76. Lewis K. 2001. In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 3: 247-254.
77. Leyes Borrajo JL, Garcia VL, Lopez CG, Rodriguez-Nuñez I, Garcia FM and Gallas TM. 2002. Efficacy of chlorhexidine mouthrinses with and without alcohol: a clinical study. *J Periodontol*, 73: 317-321.
78. Lima M, Bandeira A, Portnoi D, Ribeiro A and Chaves MA. 1992. Protective effect of a T-cell-dependent immunosuppressive, B-cell-mitogenic protein (F39EP-Si, or P90) produced by *Streptococcus intermedius*. *Infect Immun*, 60: 3571-3578.
79. Loe H and Schiott CR. 1970. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res*, 5: 79-83.
80. Lorenz K, Bruhn G, Heumann C, Netuschil L, Brex M and Hoffmann T. 2006. Effect of two new chlorhexidine mouthrinses on the development of dental plaque, gingivitis, and discolouration. A randomized, investigator-blind, placebo-controlled, 3-week experimental gingivitis study. *J Clin Periodontol*, 33: 561-567.
81. Magnusson I and Walker CB. 1996. Refractory periodontitis or recurrence of disease. *J Clin Periodontol*, 23: 289-292.
82. Mandel ID. 1994. Antimicrobial mouthrinses: overview and update. *J Am Dent Assoc*, 2: 2-10.

83. Marsh PD. 1992. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res*, 71: 1431-1438.
84. McBain AJ, Ledder RG, Sreenivasan P and Gilbert P. 2004. Selection for high-level resistance by chronic triclosan exposure is not universal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53: 772-777.
85. Mendieta C, Vallcorba N, Binney A and Addy M. 1994. Comparison of 2 chlorhexidine mouthwashes on plaque regrowth in vivo and dietary staining in vitro. *J Clin Periodontol*, 21: 296-300.
86. Meyer DH, Sreenivasan PK and Fives-Taylor PM. 1991. Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect and Immun*, 59: 2719-2726.
87. Mikolajczyk-Pawlinska J, Kordula T, Pavloff N, Pemberton PA, Chen WC, Travis J and Potempa J. 1998. Genetic variation of *Porphyromonas gingivalis* genes encoding gingipains, cysteine proteinases with arginine or lysine specificity. *Biol Chem*, 379: 205-211.
88. Moran J, Addy M, Jackson R and Newcombe RG. 2000. Comparative effects of quaternary ammonium mouthrinses on 4-day plaque regrowth. *J Clin Periodontol*, 27: 37-40.
89. Nagamune H, Whaley RA, Goto T, Inai Y, Maeda T, Hardie JM and Kourai H. 2000. Distribution of the Intermedilysin gene among the anginosus group *Streptococci* and correlation between Intermedilysin production and deep-seated infection with *Streptococcus intermedius*. *J Clin Microbiol*, 38: 200-226.
90. Nikaido H and Takatsuka Y. 2008. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta*, Publikation noch nicht gedruckt.
91. Nunn ME. 2003. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol 2000*, 32: 11-23.
92. Overholser CD, Meiller TF, DePaola LG, Minah GE and Niehaus C. 1990. Comparative effects of 2 chemotherapeutic mouthrinses on the development of supragingival dental plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol*, 17: 575-579.
93. Page RC. 1995. Critical issues in Periodontal Research. *J Dent Res*, 74: 1118-1128.
94. Page RC and Kornman KS. 1997. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, 14: 9-11.
95. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ and Kornman K. 1997. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*, 14: 216- 248.
96. Pan PH, Finnegan MB, Sturdivant L and Barnett ML. 1999. Comparative antimicrobial activity of an essential oil and an amine fluoride/ stannous fluoride mouthrinse in vitro. *J Clin Periodontol*, 26: 474-476.

97. Park JB and Park NH. 1989. Effect of chlorhexidine on the in vitro and in vivo herpes simplex virus infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 67: 149-153.
98. Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 20-51.
99. Poole K. 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*, 31: 55-64.
100. Potempa J, Pike R and Travis J. 1997. Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* (gingipains) using peptidyl chloromethanes. *Biol Chem*, 378: 223-230.
101. Pucher JJ and Daniel JC. 1992. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol*, 63: 526-532.
102. Puig Silla M, Company JMM and Almerich Silla JM. 2008. Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 13: 257-260.
103. Renton-Harper P, Addy M, Moran J, Doherty FM and Newcombe RG. 1996. A comparison of chlorhexidine, cetylpyridinium chloride, triclosan, and C31G mouthrinse products for plaque inhibition. *J Periodontol*, 67: 486-489.
104. Riep BG, Bernimoulin JP and Barnett ML. 1999. Comparative antiplaque effectiveness of an essential oil and an amine fluoride/ stannous fluoride mouthrinse. *J Clin Periodontol*, 26: 164-168.
105. Roldán S, Herrera D, Santa-Cruz I, O'Connor A, González I and Sanz M. 2004. Comparative effects of different chlorhexidine mouth-rinse formulations on volatile sulphur compounds and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol*, 31: 1128-1134.
106. Russell AD. 2000. Do biocides select for antibiotic resistance? *J Pharm Pharmacol*, 52: 227-233.
107. Russell AD, Tattawasart U, Maillard JY and Furr JR. 1998. Possible Link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 2151.
108. Salvi GE, Ramseier CA, Kandylaki M, Sigrist L, Awedowa E and Lang NP. 2005. Experimental gingivitis in cigarette smokers. A clinical and microbiological study. *J Clin Periodontol*, 32: 441-447.
109. Saxton CA. 1989. Maintenance of gingival health by a dentifrice containing zinc citrate and triclosan. *J Dent Res*, 68: 1724-1726.
110. Schiott CR. 1973. Effect of chlorhexidine on the microflora of the oral cavity. *J Periodontal Res Suppl*, 12: 7-10.

111. Schuster GS. 1999. Oral flora and pathogenic organisms. *Infect Dis Clin North Am*, 13: 757-774.
112. Shah HM, Shah MN, Gokani VN and Jethal BS. 1993. A comparative, qualitative and quantitative antimicrobial efficacies of mouthrinses containing chlorhexidine gluconate and essential oils. *Indian J Dent Res*, 4: 103-111.
113. Shapira L, Champagne C, Van Dyke TE and Amar S. 1998. Strain-dependent activation of monocytes and inflammatory macrophages by lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect and Immun*, 66: 2736-2742.
114. Sigusch B. 1998. Die früh beginnende und rasch fortschreitende Parodontitis. Eine Diagnose- und Therapiekonzeption. *Parodontol*, 1: 21-31.
115. Sigusch B, Beier M, Klinger G, Pfister W and Glockmann E. 2001. A 2-step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol*, 72: 275-283.
116. Sigusch B, Pfister W, Klinger G and Glockmann E. 2000. Adjuvant antibiotic therapy as a 2-step treatment concept in early-onset periodontitis: a strategy for eradication of bacteria that cause periodontitis. *Dtsch Med Wochenschr*, 125: 1186-1191.
117. Siu LK. 2002. Antibiotics: action and resistance in gram-negative bacteria. *J Microbiol Immunol Infect*, 35: 1-11.
118. Slavkin HC. 1997. Benefit-to-risk ratio: the challenge of antibiotic drug resistance. *J Am Dent Assoc*, 128: 1447-1451.
119. Slots J and Pallasch TJ. 1996. Dentist's role in halting antimicrobial resistance. *J Dent Res*, 75: 1338-1341.
120. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C and Kent Jr. RL. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25: 134-144.
121. Sundqvist G, Carlsson J, Herrmann B and Tarnvik A. 1985. Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black-pigmented *Bacteroides*. *J Med Microbiol*, 19: 85-94.
122. Takahashi N, Sato T and Yamada T. 2000. Metabolic pathways for cytotoxic end product formation from glutamate- and aspartate-containing peptides by *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, 182: 4704-4710.
123. Tambe SM, Sampath L and Modak SM. 2001. In vitro evaluation of the risk of developing bacterial resistance to antiseptics and antibiotics used in medical devices. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 589-598.
124. ThrowerY, Pinney RJ and Wilson M. 1997. Susceptibilities of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilms to oral antiseptics. *J Med Microbiol*, 46: 425-429.

125. Tobgi RS, Samaranayake LP and Macfarlane TW. 1987. Adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells exposed to chlorhexidine gluconate. *J Med Vet Mycol*, 25: 335-338.
126. Van der Velden U. 2005. Purpose and problems of periodontal disease classification. *Periodontol* 2000, 39: 13-21.
127. Van Strydonck DA, Timmerman MF, van der Velden U and van der Weijden GA. 2005. Plaque inhibition of two commercially available chlorhexidine mouthrinses. *J Clin Periodontol*, 32: 305-309.
128. Van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA and van der Velden U. 2002. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol*, 29: 1023-1028.
129. Weinberg MA and Bral M. 1998. Tetracycline and its analogues: a therapeutic paradigm in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9: 322-332.
130. Westergren G and Emilson CG. 1980. In vitro development of chlorhexidine resistance in *Streptococcus sanguis* and its transmissibility by genetic transformation. *Scand J Dent Res*, 88: 236-243.
131. Willcox MDP, Patrikakis M, Loo CY and Knox KW. 1993. Albuminbinding protein on the surface of the *Streptococcus milleri* group and characterization of the albumin receptor of *Streptococcus intermedius* C5. *J Gen Microbiol*, 139: 2451- 2458.
132. Wilson M and Henderson B. 1995. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *FEMS Microbiol Rev*, 17: 365-379.
133. Yamamoto K, Kobayashi T, Sugita N, Tai H and Yoshie H. 2007. The FcγRIIa polymorphism influences production of interleukin-1 by mononuclear cells. *International Journal of Immunogenetics*, 34: 369-372.
134. Yang HW, Huang YF, Chan Y and Chou MY. 2005. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci*, 113: 28-33.
135. Yilmaz Ö, Young PA, Lamont RJ and Kenny GE. 2003. Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to *Porphyromonas gingivalis* invasion. *Microbiol*, 149: 2417-2426.
136. Zambon JJ, Slots J and Genco RJ. 1983. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect and Immun*, 41: 19-27.
137. Ziada H, Irwin C, Mullally B, Byrne PJ and Allen E. 2007. Periodontics: 4. Surgical management of gingival and periodontal diseases. *Dent Update*, 34: 390-392, 395-396.

138. Zimmermann A, Flores-de-Jacoby L, Pan P and Pan P. 1993. Gingivitis, plaque accumulation and plaque composition under long-term use of Meridol. *J Clin Periodontol*, 20: 346-351.
139. Zilm PS, Bagley CJ, Rogers AH, Milne IR and Gully NJ. 2007. The proteomic profile of *Fusobacterium nucleatum* is regulated by growth pH. *Microbiol*, 153: 148-159.

9. Anhang

Tabelle 2 (zu Abb. 3) KBE von *P. gingivalis* ATCC 33277 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	2000	250	1600	1750
Chlorhexidin 0,06 %		20	0	5500
Chlorhexidin 0,12 %		2250	2250	2250
Chlorhexidin 0,2 %		2250	2250	2250
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		250	250	1250
Curasept 0,2 %		250	250	750
Chlorhexamed 0,06 % +F		0	0	0
Chlorhexamed 0,1 %		5500	7000	7750
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		6500	6000	7500
Oral B 0,12 %		0	0	35
Meridol+CHX 0,2 %		0	0	0
Meridol		5500	4500	5500
Listerine		50	0	0

Tabelle 3 (zu Abb. 3) KBE von *P. gingivalis* J361-1 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	2000	100	100	40
Chlorhexidin 0,06 %		10	0	6000
Chlorhexidin 0,12 %		750	50	50
Chlorhexidin 0,2 %		50	5	50
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		3500	2000	4000
Curasept 0,2 %		3250	2000	4000
Chlorhexamed 0,06 % +F		100	0	0
Chlorhexamed 0,1 %		7000	4500	5000
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		20	25	0
Oral B 0,12 %		1500	2250	3000
Meridol+CHX 0,2 %		1250	2500	2750
Meridol		5250	5750	4750
Listerine		0	0	0

Tabelle 4 (zu Abb. 3) KBE von *P. gingivalis* D5-2-2 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	2500	2500	2250	2500
Chlorhexidin 0,06 %		5000	4500	7000
Chlorhexidin 0,12 %		1750	2250	2000
Chlorhexidin 0,2 %		1750	1750	2000
Chlorhexidin 1,0 %		1000	0	0
Curasept 0,12 %		2500	2500	4000
Curasept 0,2 %		2500	2250	4000
Chlorhexamed 0,06 % +F		0	0	0
Chlorhexamed 0,1 %		7750	8000	7750
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		6500	5000	6000
Oral B 0,12 %		4500	4000	4500
Meridol+CHX 0,2 %		2500	3000	3750
Meridol		0	0	0
Listerine		0	0	0

Tabelle 5 (zu Abb. 3) KBE von *P. gingivalis* J362-1 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	250	2	1	0
Chlorhexidin 0,06 %		3000	0	3500
Chlorhexidin 0,12 %		10	50	0
Chlorhexidin 0,2 %		50	0	0
Chlorhexidin 1,0 %		5	0	0
Curasept 0,12 %		2750	500	0
Curasept 0,2 %		100	5	0
Chlorhexamed 0,06 % +F		0	0	0
Chlorhexamed 0,1 %		7000	7750	7500
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		5500	500	0
Oral B 0,12 %		150	0	25
Meridol+CHX 0,2 %		2	0	0
Meridol		0	0	0
Listerine		0	0	0

Tabelle 6 (zu Abb. 3) KBE von *P. gingivalis* J374-1 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	1500	4500	1750	3000
Chlorhexidin 0,06 %		4500	0	8000
Chlorhexidin 0,12 %		10	0	100
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	100
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		7750	5000	6000
Curasept 0,2 %		7750	7000	6000
Chlorhexamed 0,06 % + F		0	0	0
Chlorhexamed 0,1 %		8750	8500	9000
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		3000	50	0
Oral B 0,12 %		6000	5000	6000
Meridol+CHX 0,2 %		0	0	0
Meridol		0	40	0
Listerine		15	35	0

Tabelle 7 (zu Abb. 3) KBE von *P. gingivalis* J378-1 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	250	750	0	5
Chlorhexidin 0,06 %		6000	0	8500
Chlorhexidin 0,12 %		3250	2000	50
Chlorhexidin 0,2 %		10	5	0
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		3750	2250	100
Curasept 0,2 %		3750	2250	100
Chlorhexamed 0,06 % + F		0	0	0
Chlorhexamed 0,1 %		2500	1500	4000
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		50	10	25
Oral B 0,12 %		0	0	0
Meridol+CHX 0,2 %		0	0	0
Meridol		45	0	0
Listerine		0	0	0

Tabelle 8 (zu Abb. 3) KBE von *P. gingivalis* J435-1 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	2000	2000	2000	4000
Chlorhexidin 0,06 %		1500	1000	3750
Chlorhexidin 0,12 %		5000	2250	4000
Chlorhexidin 0,2 %		4750	2250	4000
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		6000	2250	4000
Curasept 0,2 %		6000	2250	4000
Chlorhexamed 0,06 % +F		0	0	0
Chlorhexamed 0,1 %		7000	7000	6500
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		0	0	0
Oral B 0,12 %		3	0	0
Meridol+CHX 0,2 %		12	6	1
Meridol		0	0	0
Listerine		0	0	0

Tabelle 9 (zu Abb. 3) KBE von *P. gingivalis* M5-1-2 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	2750	4250	0	250
Chlorhexidin 0,06 %		4500	500	8500
Chlorhexidin 0,12 %		2000	2500	5000
Chlorhexidin 0,2 %		4250	3000	3500
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		7000	6000	6000
Curasept 0,2 %		7000	6000	4500
Chlorhexamed 0,06 % +F		0	0	0
Chlorhexamed 0,1 %		5500	6500	8250
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		0	0	0
Oral B 0,12 %		7500	6750	7500
Meridol+CHX 0,2 %		5000	4500	5250
Meridol		0	0	0
Listerine		300	0	0

Tabelle 10 (zu Abb. 4) KBE von *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	100	0	0	0
Chlorhexidin 0,06 %		0	0	0
Chlorhexidin 0,12 %		0	0	0
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	0
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		0	0	0
Curasept 0,2 %		0	0	0
Chlorhexamed 0,06 % + F		0	0	0
Chlorhexamed 0,1 %		0	0	0
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		0	0	0
Oral B 0,12 %		1000	1750	8000
Meridol+CHX 0,2 %		1000	2000	8000
Meridol		15	20	2000
Listerine		0	0	0

Tabelle 11 (zu Abb. 4) KBE von *A. actinomycetemcomitans* Y4 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	1750	9500	9500	9500
Chlorhexidin 0,06 %		75	75	50
Chlorhexidin 0,12 %		0	50	8500
Chlorhexidin 0,2 %		250	4500	8000
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		3750	4500	8750
Curasept 0,2 %		3250	7500	9000
Chlorhexamed 0,06 % + F		2750	2500	2000
Chlorhexamed 0,1 %		1750	1000	2000
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		25	0	0
Oral B 0,12 %		1000	750	750
Meridol+CHX 0,2 %		150	75	8000
Meridol		250	100	100
Listerine		50	10	15

Tabelle 12 (zu Abb. 5) KBE von *F. nucleatum* ATCC 25586 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	1250	5500	6000	6000
Chlorhexidin 0,06 %		0	0	0
Chlorhexidin 0,12 %		0	0	0
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	0
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		5500	6000	5000
Curasept 0,2 %		5750	5000	5500
Chlorhexamed 0,06 % +F		0	0	0
Chlorhexamed 0,1 %		0	0	0
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		0	0	0
Oral B 0,12 %		0	0	5
Meridol+CHX 0,2 %		0	0	75
Meridol		0	0	0
Listerine		0	0	0

Tabelle 13 (zu Abb. 6) KBE von *S. constellatus* ATCC 27823 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	1750	8000	7500	5500
Chlorhexidin 0,06 %		0	0	0
Chlorhexidin 0,12 %		0	0	0
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	0
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		2500	10	0
Curasept 0,2 %		2500	2750	350
Chlorhexamed 0,06 % +F		0	0	0
Chlorhexamed 0,1 %		0	0	0
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		0	0	0
Oral B 0,12 %		0	0	0
Meridol+CHX 0,2 %		0	0	5
Meridol		0	75	0
Listerine		0	100	0

Tabelle 14 (zu Abb. 6) KBE von *S. constellatus* IL41b nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	4000	8500	6500	7000
Chlorhexidin 0,06 %		4750	3000	75
Chlorhexidin 0,12 %		0	0	0
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	0
Chlorhexidin 1,0 %		250	100	0
Curasept 0,12 %		8000	6250	3500
Curasept 0,2 %		8000	6250	7500
Chlorhexamed 0,06 % + F		250	0	0
Chlorhexamed 0,1 %		6750	4500	75
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		5500	1000	15
Oral B 0,12 %		2500	50	0
Meridol+CHX 0,2 %		0	0	0
Meridol		1000	0	0
Listerine		0	0	0

Tabelle 15 (zu Abb. 6) KBE von *S. constellatus* IL12b nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	4500	6000	7250	7000
Chlorhexidin 0,06 %		4500	4000	1500
Chlorhexidin 0,12 %		1250	750	100
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	0
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		5000	6250	6000
Curasept 0,2 %		5000	5750	6250
Chlorhexamed 0,06 % + F		4500	750	0
Chlorhexamed 0,1 %		7750	6500	2250
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		100	15	0
Oral B 0,12 %		0	0	0
Meridol+CHX 0,2 %		0	0	0
Meridol		0	0	0
Listerine		0	0	2250

Tabelle 16 (zu Abb. 6) KBE von *S. intermedius* M5-1-2 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	3500	6500	7000	6750
Chlorhexidin 0,06 %		3000	2500	1500
Chlorhexidin 0,12 %		0	0	0
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	0
Chlorhexidin 1,0 %		20	0	0
Curasept 0,12 %		6000	6500	4000
Curasept 0,2 %		6000	6500	3750
Chlorhexamed 0,06 % + F		0	0	0
Chlorhexamed 0,1 %		0	5	0
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		0	0	0
Oral B 0,12 %		0	3	3
Meridol+CHX 0,2 %		0	75	0
Meridol		0	0	0
Listerine		0	0	0

Tabelle 17 (zu Abb. 6) KBE von *S. intermedius* M9-3-4 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	450	6000	6000	4250
Chlorhexidin 0,06 %		50	10	0
Chlorhexidin 0,12 %		0	0	0
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	0
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		3500	750	15
Curasept 0,2 %		4000	3500	30
Chlorhexamed 0,06 % + F		0	0	0
Chlorhexamed 0,1 %		100	0	0
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		0	0	0
Oral B 0,12 %		0	0	0
Meridol+CHX 0,2 %		2000	0	1
Meridol		0	0	0
Listerine		0	0	0

Tabelle 18 (zu Abb. 7) KBE von *S. salivarius* ATCC 7073 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	3500	7000	8000	8000
Chlorhexidin 0,06 %		2750	1000	15
Chlorhexidin 0,12 %		0	30	0
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	0
Chlorhexidin 1,0 %		0	50	0
Curasept 0,12 %		6750	4500	2500
Curasept 0,2 %		6750	7000	4250
Chlorhexamed 0,06 % +F		5250	2500	100
Chlorhexamed 0,1 %		1250	1000	75
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		0	0	0
Oral B 0,12 %		0	0	0
Meridol+CHX 0,2 %		0	0	0
Meridol		0	0	0
Listerine		0	0	0

Tabelle 19 (zu Abb. 7) KBE von *S. oralis* M9-3-3 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	200	8000	8000	8000
Chlorhexidin 0,06 %		250	250	7750
Chlorhexidin 0,12 %		0	0	0
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	0
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		6000	5750	3500
Curasept 0,2 %		6000	5750	7750
Chlorhexamed 0,06 % +F		75	50	0
Chlorhexamed 0,1 %		2500	2500	250
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		150	50	75
Oral B 0,12 %		0	0	0
Meridol+CHX 0,2 %		0	0	0
Meridol		0	0	0
Listerine		25	1500	5500

Tabelle 20 (zu Abb. 7) KBE von *S. oralis* J16/02 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	1750	5750	6500	7500
Chlorhexidin 0,06 %		3	0	0
Chlorhexidin 0,12 %		3	0	0
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	0
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		5750	4250	3250
Curasept 0,2 %		5750	4500	5500
Chlorhexamed 0,06 % +F		3500	1250	750
Chlorhexamed 0,1 %		4000	3500	6750
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		25	0	0
Oral B 0,12 %		3000	2500	2500
Meridol+CHX 0,2 %		60	25	7
Meridol		0	0	0
Listerine		0	0	3000

Tabelle 21 (zu Abb. 7) KBE von *S. oralis* J14-1/02 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	4000	5750	7500	6500
Chlorhexidin 0,06 %		5	10	0
Chlorhexidin 0,12 %		0	0	0
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	0
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		4500	6250	4000
Curasept 0,2 %		6000	6250	6000
Chlorhexamed 0,06 % +F		250	15	0
Chlorhexamed 0,1 %		0	0	0
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		0	0	0
Oral B 0,12 %		2000	75	5
Meridol+CHX 0,2 %		0	0	0
Meridol		0	0	0
Listerine		0	0	2500

Tabelle 22 (zu Abb. 7) KBE von *S. sanguinis* IL108a nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	3500	6000	7000	7000
Chlorhexidin 0,06 %		25	50	0
Chlorhexidin 0,12 %		0	0	0
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	0
Chlorhexidin 1,0 %		0	11	0
Curasept 0,12 %		6000	5750	2750
Curasept 0,2 %		5750	6000	4000
Chlorhexamed 0,06 % + F		0	0	0
Chlorhexamed 0,1 %		0	0	0
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		0	0	0
Oral B 0,12 %		750	80	10
Meridol+CHX 0,2 %		0	4	100
Meridol		5	0	0
Listerine		0	0	0

Tabelle 23 (zu Abb. 8) KBE von *K. oxytoca* JGr2 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	4000	9000	9500	9750
Chlorhexidin 0,06 %		1500	5500	10000
Chlorhexidin 0,12 %		8000	500	1500
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	0
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		8000	9000	9500
Curasept 0,2 %		8000	10000	9000
Chlorhexamed 0,06 % + F		25	5	9750
Chlorhexamed 0,1 %		250	75	7000
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		0	0	0
Oral B 0,12 %		0	0	9000
Meridol+CHX 0,2 %		0	0	4500
Meridol		200	0	0
Listerine		0	0	9000

Tabelle 24 (zu Abb. 8) KBE von *E. cloacae* JGr1 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	5500	10000	10000	10000
Chlorhexidin 0,06 %		4500	9500	10000
Chlorhexidin 0,12 %		0	1250	9500
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	1750
Chlorhexidin 1,0 %		0	0	0
Curasept 0,12 %		8250	11000	9500
Curasept 0,2 %		9000	10000	9500
Chlorhexamed 0,06 % +F		500	2000	10000
Chlorhexamed 0,1 %		5500	10000	10000
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		0	0	0
Oral B 0,12 %		6500	8000	8500
Meridol+CHX 0,2 %		6000	7750	8500
Meridol		5000	9000	9000
Listerine		0	0	0

Tabelle 25 (zu Abb. 9) KBE von *C. albicans* ATCC 76615 nach 1 h, 6 h und 18 h bei vorausgegangener einminütiger Inkubation mit den Mundspüllösungen

	Anfangswert	nach 1 h	nach 6 h	nach 18 h
Kontrolle	800	1750	2000	2000
Chlorhexidin 0,06 %		15	25	5000
Chlorhexidin 0,12 %		0	0	0
Chlorhexidin 0,2 %		0	0	0
Chlorhexidin 1,0 %		4	0	0
Curasept 0,12 %		70	5	0
Curasept 0,2 %		800	1250	65
Chlorhexamed 0,06 % +F		500	150	7000
Chlorhexamed 0,1 %		0	0	0
Chlorhexamed-Gel 1,0 %		0	0	0
Oral B 0,12 %		0	0	0
Meridol+CHX 0,2 %		6	1	0
Meridol		2	10	0
Listerine		0	0	0

Tabelle 26 (zu Abb. 10, 12 und 14) MHK-Werte der anaeroben/mikroaerophilen Bakterien vor, nach 25 und nach 50 Passagen, Angaben in %; Plattenkonzentrationen: 0,002% bei CHX; 0,5% bei Meridol und 0,5% bei Listerine

Stamm	MHK vor Passage			MHK nach 25 Passagen			MHK nach 50 Passagen		
	Meridol	Lister.	CHX	Meridol	Lister.	CHX	Meridol	Lister.	CHX
P.g. ATCC 33277	10	10	0,05	20	---	0,002	5	---	0,002
P.g. D5-2-2	10	10	0,05	5	20	---	5	---	---
P.g. J 361-1	10	10	0,05	50	20	0,05	5	> 50	0,002
P.g. J 362-1	10	10	0,1	20	10	0,2	5	20	---
P.g. J 374-1	10	10	0,1	20	10	0,2	50	20	---
P.g. J 378-1	10	10	0,02	10	10	0,2	5	10	0,01
P.g. J 435-1	10	10	0,02	50	10	0,1	5	10	0,001
P.g. M5-1-2	10	10	0,05	10	20	0,001	5	20	0,001
A.a. Y4	10	10	0,1	50	10	0,005	---	---	0,02
A.a. ATCC 33384	10	10	0,05	50	10	0,1	5	> 50	0,02
A.a. MJ 22	10	10	0,02	---	---	---	---	---	---
A.a. MJ 26	10	20	0,05	10	10	---	10	20	---
A.a. MJ 95	10	10	0,05	---	---	---	---	---	---
A.a. MJ 96	10	10	0,05	---	---	---	---	---	---
F.n. ATCC 25586	10	10	0,1	20	50	---	---	---	---

Tabelle 27 (zu Abb. 11, 13 und 15) MHK-Werte der aeroben Bakterien vor, nach 25 und nach 50 Passagen, Angaben in %; Plattenkonzentrationen: 0,02% bei CHX; 1% bei Meridol und 1% bei Listerine

Stamm	MHK vor Passage			MHK nach 25 Passagen			MHK nach 50 Passagen		
	Meridol	Lister.	CHX	Meridol	Lister.	CHX	Meridol	Lister.	CHX
S. int. M5-1-2	10	50	0,1	10	50	0,05	10	20	0,005
S. int. M9-3-4	10	50	0,2	10	50	0,1	5	20	0,01
S.const. ATCC 27823	10	20	0,1	10	50	0,05	10	20	0,005
S.const. IL41b	10	10	0,1	10	50	0,05	10	50	0,01
S.const. IL12b	10	20	0,1	10	20	0,05	10	20	0,005
S. sang. IL108a	10	50	0,1	10	50	0,05	10	> 50	0,005
S.oralis J14- 1/02	10	20	0,2	10	20	0,05	5	> 50	0,002
S.oralis J16/02	10	20	0,5	10	20	0,2	10	50	0,005
S.oralis M9-3-3	10	50	0,5	10	50	1	10	50	0,2
S. sal. ATCC 7073	10	20	0,1	50	50	> 1	10	50	---
C. albi. ATCC 76615	10	10	0,5	20	50	1	10	> 50	0,01
E. cloa. JGr1	50	50	> 1	50	50	> 1	> 50	50	0,05
K. oxy. JGr2	20	20	1	50	20	1	50	50	0,5

Tabelle 28 (zu Abb. 16) KBE nach 3 h (aerobe Bakterien) bzw. 6 h (anaerobe/mikroaerophile Bakterien) Inkubationszeit mit 0,001%igem Chlorhexidin mit und ohne Reserpin

Stamm	Kontrolle	Kontr.+Reserpin	CHX	CHX+Reserpin
S.const. IL41b	450000	425000	1000	50000
S.sal. ATCC 7073	450000	462500	125000	125000
S.oralis J14-1/02	475000	475000	175000	150000
K.oxy. JGr2	475000	475000	17500	400000
P.g. J361-1	250000	275000	187500	175000
P.g. ATCC 33277	175000	200000	50000	50000
P.g. J435-1	250000	250000	325000	300000
A.a. Y4	275000	375000	5000	5000
A.a. ATCC 33384	325000	375000	50000	50000
F.n. ATCC 25586	50000	10000	12500	15000

Tabelle 29 (zu Abb. 17) KBE nach 3 h (aerobe Bakterien) bzw. 6 h (anaerobe/mikroaerophile Bakterien) Inkubationszeit mit 10%igem Listerine mit und ohne Reserpin

Stamm	Kontrolle	Kontr.+Reserpin	Listerine	Lis.+Reserpin
S.const. IL41b	450000	425000	400000	400000
S.sal. ATCC 7073	450000	462500	425000	437500
S.oralis J14-1/02	475000	475000	412500	450000
K.oxy. JGr2	475000	475000	425000	350000
P.g. J361-1	250000	275000	200000	175000
P.g. ATCC 33277	175000	200000	100000	87500
P.g. J435-1	250000	250000	275000	250000
A.a. Y4	275000	375000	125000	112500
A.a. ATCC 33384	325000	375000	175000	175000
F.n. ATCC 25586	50000	10000	---	---

Tabelle 30 (zu Abb. 18) KBE nach 3 h (aerobe Bakterien) bzw. 6 h (anaerobe/mikroaerophile Bakterien) Inkubationszeit mit 5%igem Meridol mit und ohne Reserpin

Stamm	Kontrolle	Kontr.+Reserpin	Meridol	Mer.+Reserpin
S.const. IL41b	450000	425000	---	---
S.sal. ATCC 7073	450000	462500	---	---
S.oralis J14-1/02	475000	475000	---	---
K.oxy. JGr2	475000	475000	375000	400000
P.g. J361-1	250000	275000	---	---
P.g. ATCC 33277	175000	200000	---	---
P.g. J435-1	250000	250000	---	---
A.a. Y4	275000	375000	---	---
A.a. ATCC 33384	325000	375000	4	---
F.n. ATCC 25586	50000	10000	---	---

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. habil. S. Eick und Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Pfister für die Überlassung des Themas bedanken sowie für die gute Betreuung meiner Arbeit. Mein besonderer Dank gilt dabei Fr. Dr. Eick für ihre fachliche Beratung und ihre ständige Ansprechbarkeit bei auftretenden Fragen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. habil. E. Straube, dass ich die Einrichtungen seines Institutes als Doktorand nutzen durfte.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie für ihre Unterstützung bei organisatorischen Belangen. Besonders danke ich Frau C. Ranke, die mir bei Fragen zur Versuchsdurchführung stets hilfreich zur Seite stand.

Meiner Familie möchte ich für ihre liebevolle Unterstützung während meiner Studienzeit und darüber hinaus ganz herzlich danken.

11. Lebenslauf

Name:	Susann Goltz	
Geburtsname:	Richter	
Geburtstag:	23. Juni 1978	
Geburtsort:	Altenburg	
Schulbildung:	1985-1991	POS Lerchenberg in Altenburg
	1991-1997	Lerchenberggymnasium in Altenburg
	Juni 1997	Abitur
Berufliche Ausbildung:	09/1997-02/2001	Ausbildung zur Zahntechnikerin in Altenburg und Schmölln
	02/2001-09/2001	berufliche Tätigkeit als Zahntechnikerin in Schmölln
Universität:	10/2001-03/2007	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
	05.02. 2007	Approbation als Zahnärztin
Erziehungsurlaub:	04/2007-02/2008	nach der Geburt meiner Tochter im April 2007
Berufliche Tätigkeit:	seit 03/2008	Vorbereitungsassistentin in der ZA-Praxis Dr. T. Friedrich in Zeitz

Jena, den

12. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. S. Eick und Prof. Dr. W. Pfister,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den